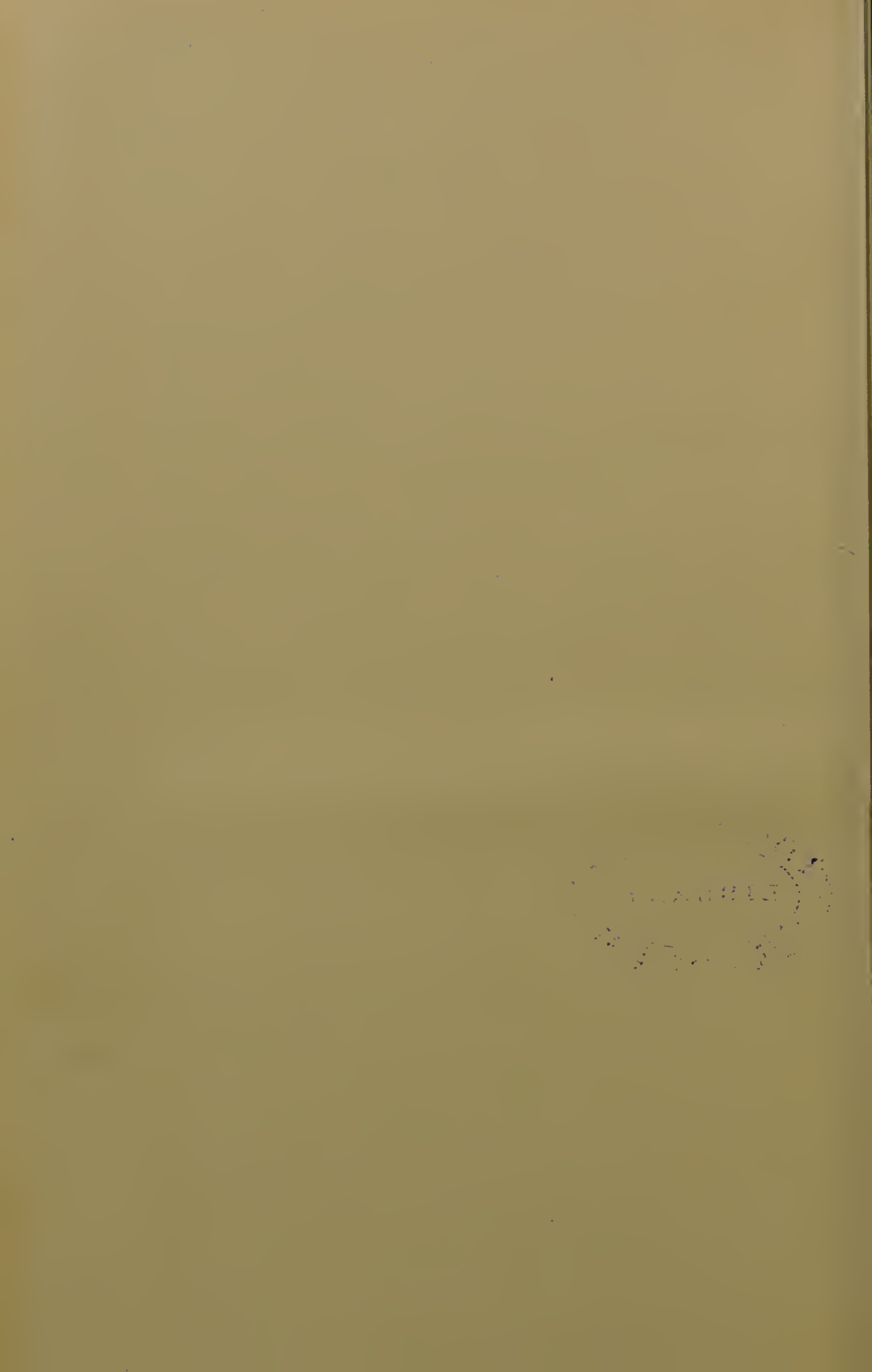




TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE ET SÉROTHÉRAPIQUE

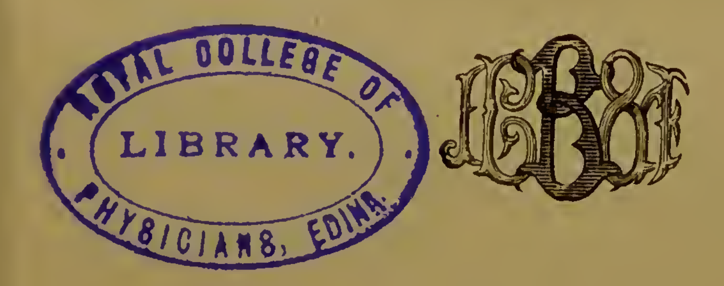
GUIDE POUR LES TRAVAUX DU LABORATOIRE

PAR

Le Dr Albert BESSON

MÉDECIN AIDE-MAJOR DE 1re CLASSE
CHEF DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE A L'HOPITAL MILITAIRE DE RENNES

Avec 223 figures intercalées dans le texte
NOIRES ET COLORIÉES



PARIS
LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS
19, Rue Hautefeuille, près du Boulevard Saint-Germain

1898

PRÉFACE

La Microbiologie constitue aujourd'hui une branche importante des études médicales ; tout médecin doit être capable de se livrer aux recherches élémentaires, telles que celles du bacille de la tuberculose, du bacille de la diphtérie, etc. ; toutes les Facultés ont installé des laboratoires, où les élèves sont initiés à l'étude des bactéries.

Ce livre est destiné à guider le médecin dans les travaux du laboratoire ; notre préoccupation a été de faire un véritable vade-mecum, que le débutant pourra suivre pas à pas et où l'observateur exercé trouvera les renseignements de nature à le diriger dans ses recherches.

Nous avons systématiquement écarté toute considération théorique, toute indication bibliographique, qui sont fournies par les traités classiques de bactériologie.

La première partie comprend la *technique générale*, applicable à tous les microbes. Dans chaque chapitre, nous décrivons les différents procédés qui ont été recommandés par les auteurs, mais nous indiquons toujours un procédé de choix, que nous conseillons et dont la mise en pratique donnera toute satisfaction au débutant.

La seconde partie traite des particularités de la *technique spéciale*, propres à chaque microbe.

Ce livre s'adressant surtout aux médecins, nous insistons sur les germes pathogènes pour l'homme ; nous avons ajouté la description de quelques espèces spéciales aux animaux.

Nous avons joint à l'étude des Bactéries celle des Champignons parasites et aussi celle des Protozoaires, dont le rôle pathogène est bien connu aujourd'hui et qui tendent à prendre une place de plus en plus importante dans l'histoire naturelle médicale.

La troisième et dernière partie comprend l'exposé rapide des méthodes d'*analyse bactériologique de l'air* et *de l'eau*.

Les figures ont été l'objet de tous nos soins ; à propos de chaque microbe, nous avons nous-même dessiné en couleur, d'après nos préparations, l'aspect que l'on obtient en suivant les indications du texte : l'élève y trouvera un guide sûr pour l'interprétation de ses préparations.

Qu'il nous soit permis de remercier ici les Maîtres qui nous ont initié à l'étude de la bactériologie ; nous avons fait de larges emprunts à leur enseignement : si ce livre trouve quelque faveur, nous n'oublierons pas que c'est à eux qu'en revient tout l'honneur.

A. BESSON.

Rennes, 15 octobre 1897.

TABLE ANALYTIQUE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE GÉNÉRALE.

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUE SPÉCIALE.

TROISIÈME PARTIE

ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES.

PRÉCIS

DE

TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE GÉNÉRALE

CHAPITRE PREMIER

STÉRILISATION

Stériliser, c'est détruire les germes vivants.

Les microbes sont répandus dans tous les milieux extérieurs (sol, air, eau) et souillent tous les objets qui nous entourent.

De la nécessité d'opérer constamment avec des cultures pures découle l'obligation de la stérilisation : il faut débarrasser les vases, les milieux nutritifs, les instruments, des germes qu'ils contiennent.

De plus, quand ces objets sont *stérilisés*, sont *purs*, il faut les préserver de tout contact susceptible de leur apporter à nouveau des germes, et en particulier des poussières atmosphériques. Pour cela, quand il s'agit de flacons, ballons, tubes, à ouverture étroite, on les bouche, avant de les stériliser, avec un tampon d'ouate modérément serré; au contraire les verres, cristallisoirs, boîtes, sont couverts ou enveloppés de papier.

1° **Fermeture à l'ouate.** — Prendre un fragment d'ouate non hydrophile, le replier sur lui-même, présenter le sommet du tampon ainsi obtenu à l'orifice du vase à boucher, l'y faire pénétrer, par un mouvement de vrille en serrant légèrement, sur une hauteur de 2 à 3 centimètres; la partie

supérieure du bouchon doit dépasser un peu le bord de l'orifice. Ne pas craindre de faire les tampons un peu gros.



Fig. 1. — Verre couvert de papier.

2° **Fermeture au papier.** — Se servir de papier filtre ordinaire ou de papier à affiches.

a. Les cristallisoirs, boîtes, etc., sont enveloppés entièrement dans plusieurs doubles de papier.

b. Pour les verres à expériences, on se contente d'en couvrir l'ouverture avec de larges morceaux de papier (mis en double de préférence) dont les bords sont repliés et viennent envelopper le corps du verre. En repliant le papier, éviter de le déchirer sur les bords du verre, ce qui rendrait l'occlusion illusoire.

Nous possédons plusieurs procédés de stérilisation; en technique bactériologique, on s'adresse de préférence aux procédés physiques : chaleur, filtration ; l'emploi des antiseptiques n'est qu'exceptionnel. Nous décrirons les méthodes de stérilisation les plus fréquemment utilisées.

I. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR SÈCHE.

A. **Stérilisation au rouge.** — Le procédé le plus simple de stérilisation consiste à porter les instruments à la température du rouge, dans la flamme d'une lampe à alcool ou d'un bec de Bunsen.

Ce procédé, en raison de la détérioration qu'il entraine, n'est applicable qu'à un nombre restreint d'instruments : fils de platine, baguettes de verre, palettes de fer ou de nickel, couteaux dans certains cas, etc.

Avoir soin de laisser refroidir l'objet porté au rouge avant de le mettre en contact avec le produit à ensemencer.

B. **Flambage.** — 1° Le flambage peut être pratiqué en passant rapidement l'objet à stériliser dans une flamme chaude, il n'est alors applicable qu'aux objets de petites dimensions et à surface polie, dépourvue d'anfractuosités pouvant protéger les germes à détruire (pipettes et baguettes de verre par exemple).

2° D'ordinaire, on utilise le *four à flamber*.

Le *four Pasteur* (fig. 2) est en usage dans tous les laboratoires ; on y stérilise les objets de verrerie, la porcelaine, les instruments d'acier à manche de nickel, etc. Les composés organiques, sauf l'ouate et le papier, ne sont pas susceptibles d'être stérilisés par ce procédé.

Pour que la stérilisation soit complète, il faut que les objets soient portés et maintenus trente minutes à une température d'environ 180°.

A cette température, l'ouate et le papier roussissent légèrement, prennent une coloration brun clair.

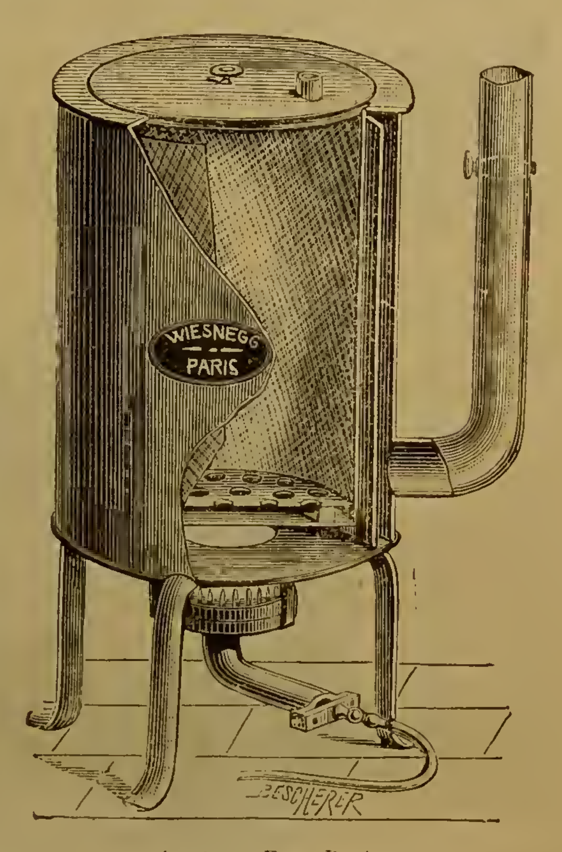


Fig. 2. — Four Pasteur.

Description. — Le four Pasteur est constitué par un cylindre de tôle à double paroi au-dessous duquel est placé un fort brûleur à gaz. La paroi interne limite une cavité cylindrique dans laquelle se trouve un panier en tôle métallique où l'on dispose les objets à stériliser ; la partie supérieure en est fermée au moyen d'un couvercle portant une tubulure qui reçoit, par l'intermédiaire d'un bouchon perforé, un thermomètre à mercure gradué jusqu'à + 200°.

Le brûleur à gaz étant allumé, l'air chaud lèche le fond de l'étuve, circule dans la double paroi et s'échappe par un tuyau de fumée.

Fonctionnement. — *a.* Les objets à stériliser ont été préalablement lavés avec soin et rincés à grande eau pour les débarrasser de toute matière organique qui se carboniserait pendant l'opération. Ils sont ensuite séchés soigneusement, autrement ils casseraient pendant le flambage. Ils sont enfin bouchés comme il a été dit plus haut.

b. Les objets ainsi préparés sont disposés dans le panier de toile métallique ; il faut avoir soin que l'ouate et le papier ne touchent pas au fond, ni aux parois du four, sous peine de se carboniser. L'ouate et le papier doivent brunir légèrement, mais en aucun cas on ne peut faire usage d'instruments dont le papier et l'ouate auraient été carbonisés : en se décomposant par la chaleur, ces corps

produisent un goudron riche en matières antiseptiques et dont la présence dans les vases gênerait les cultures; quand cet accident arrive, les objets doivent être lavés et stérilisés à nouveau.

Nous recommandons de disposer au fond du four une ou deux briques réfractaires; on empêche ainsi le contact immédiat des objets avec le métal surchauffé, ce qui prévient la carbonisation du papier et supprime une cause importante de casse pendant la chauffe.

c. Placer le couvercle et enfoncer le thermomètre profondément dans le four.

d. Allumer en ayant soin d'approcher du brûleur une allumette enflammée avant d'ouvrir le robinet du gaz (si l'on ouvrait d'abord

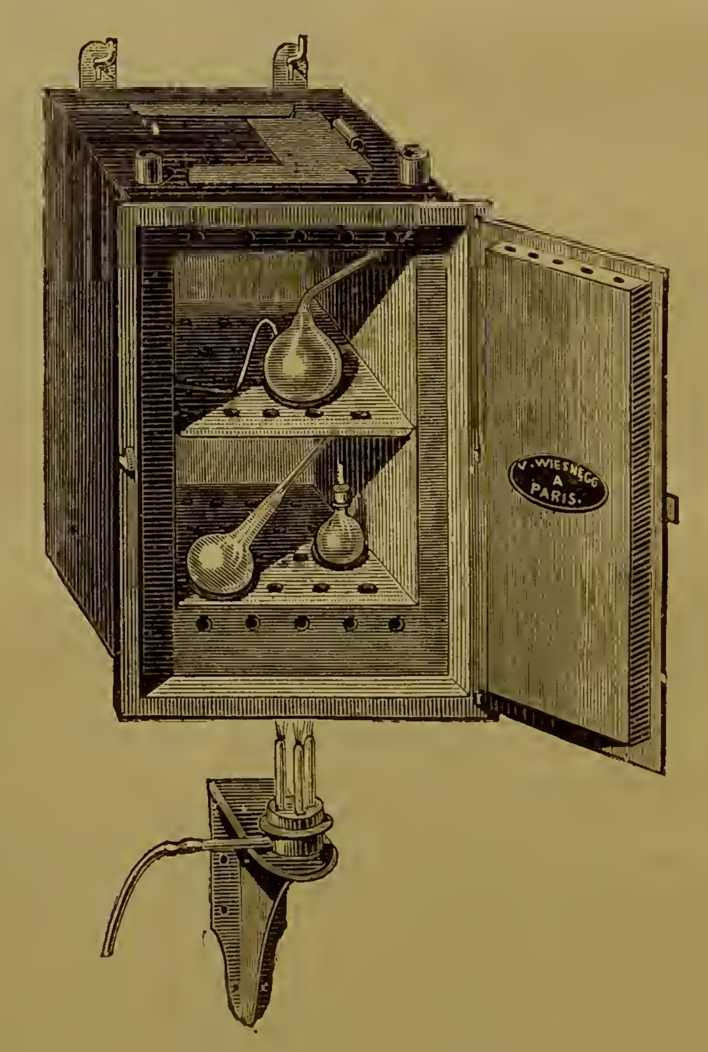


Fig. 3. — Four de Chantemesse.

le robinet, le gaz se mélangerait à l'air dans la double paroi de l'appareil et il se produirait une explosion au moment où l'on approche l'allumette).

e. Chauffer lentement, surtout si les objets à stériliser sont en verre épais (verre à pied, cristallisoirs, etc.), ces objets cassant facilement par une élévation brusque de température.

Quand la température de 175°-180° est atteinte, fermer peu à peu le robinet du gaz de façon à mettre le brûleur en veilleuse et maintenir la température pendant environ une demi-heure.

On arrive facilement avec un peu d'habitude à régler par tâtonnements la température du four; il arrive souvent qu'en voulant baisser la flamme, on l'éteint à chaque coup : on évite ce petit ennui en ne tournant pas avec la main la clef du robinet du gaz, mais en la faisant avancer peu à peu par de petits coups donnés avec un corps pesant, un marteau ou une clef d'autoclave par exemple; on parvient ainsi à régler la flamme avec une grande précision.

L'ouate et le papier brunissant légèrement à la température de stérilisation, on peut, avec de l'habitude, se passer du thermomètre pour conduire l'opération ; on réglera la marche d'après la couleur du papier : dès qu'il aura une teinte brune, on saura que la température de 180° est atteinte et on baissera la flamme.

f. L'opération terminée, on éteint le gaz. On ne retire la verrerie du four qu'après refroidissement complet, pour éviter la casse qui résulterait de l'exposition brusque des objets chauds à l'air froid.

Le stérilisateur à air chaud de Chantemesse (fig. 3) est basé sur le même principe que le four Pasteur, dont il ne diffère que par la forme : il est rectangulaire, disposé en forme d'armoire, et renferme des tablettes intérieures mobiles permettant d'y placer les objets sur plusieurs étages. Le maniement de cet appareil est identique à celui du four Pasteur.

II. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR HUMIDE.

Il existe trois procédés de stérilisation par la chaleur humide : 1° chauffage dans l'eau ou la vapeur à 100° ; 2° chauffage dans la vapeur sous-pression ; 3° chauffage discontinu à basse température.

A. — CHAUFFAGE A 100°.

L'ébullition ou l'exposition à la vapeur à 100° ne suffisent pas, même quand leur action est prolongée, pour tuer tous les microbes; beaucoup de ceux-ci présentent des formes de résistance, les *spores*, qui leur permettent de résister à la température de l'eau bouillante.

Aussi, en France, n'emploie-t-on qu'exceptionnellement ce mode de stérilisation ; on l'utilise cependant pour stériliser les seringues destinées aux inoculations : en faisant bouillir l'appareil pendant

quinze à vingt minutes, on obtient une asepsie généralement suffisante.

En Allemagne, on utilise beaucoup le *stérilisateur de Koch* par la vapeur à 100° (fig. 4), mais avec cet appareil une stérilisation unique ne suffit pas; il faut répéter au moins deux fois et même trois fois l'opération, à vingt-quatre heures d'intervalle, c'est la méthode du *chauffage discontinu* (Tyndall).

Tyndall, prenant une infusion de foin, ne pouvait la stériliser par l'ébullition : cette infusion contient des bacilles et des spores (*B. subtilis*); à 100° les bacilles sont détruits, tandis que les spores résistent. Mais soumettant le lendemain, puis le surlendemain, la même infusion à de nouvelles ébullitions, Tyndall la trouvait stérile après le troisième chauffage. Tel est le principe du chauffage discontinu. Les spores, disait Tyndall, non détruites par la première ébullition, ont germé dans l'intervalle ; elles ont donné des bacilles qui sont détruits par la seconde opération; quelques spores ont-elles encore échappé, elles auront germé lors de la troisième ébullition et la stérilisation sera définitive. A cette explication, on préfère aujourd'hui celle qui consiste à admettre une atténuation progressive de la résistance des microbes sous l'influence de l'action répétée de la chaleur.

Stérilisateur de Koch. — Il est constitué par une marmite cylindrique en cuivre munie d'un niveau d'eau et prolongée par un cylindre métallique qui sert de chambre de stérilisation. L'intérieur du cylindre peut recevoir des plateaux mobiles destinés à supporter les objets à stériliser. La partie supérieure est fermée par un couvercle portant une tubulure pour le passage d'un thermomètre.

Cet appareil peut servir à stériliser les milieux de culture ; pour faciliter la stérilisation, ces milieux doivent être contenus dans des récipients préalablement flambés.

Fonctionnement. — 1° Verser de l'eau dans la chaudière jusqu'au trait marqué sur le tube de niveau. Adapter le cylindre sur la chaudière, y disposer les objets à stériliser. Placer le couvercle et le thermomètre.

2° Allumer le brûleur à gaz sous la chaudière ; noter le moment où la vapeur s'échappe autour du couvercle (le thermomètre marquant 98° à 100°); à partir de ce moment, prolonger l'opération pendant trente minutes.

3° Recommencer la stérilisation le lendemain et le troisième jour.

Quand on sort les objets du stérilisateur, il arrive fréquemment que les bouchons d'ouate sont mouillés par l'eau de condensation ; il faut avoir soin de porter alors les objets pendant quelques heures dans une étuve sèche, car le bouchon d'ouate n'est un obstacle à la pénétration des germes extérieurs qu'à la condition d'être absolument privé d'humidité.

Il existe plusieurs modifications de l'appareil primitif de Koch. Un modèle construit par Wiesnegg possède une double paroi où circule la vapeur avant de s'échapper : on obtient ainsi une constance absolue de la



Fig. 4. — Stérilisateur à vapeur de Koch.

température à l'intérieur du stérilisateur; il est muni en outre d'une chaudière à niveau constant; le maniement est le même que pour l'appareil de Koch.

F. — CHAUFFAGE DANS LA VAPEUR SOUS PRESSION.

La stérilisation par la vapeur sous pression est couramment employée dans les laboratoires français. On utilise ce procédé pour

stériliser les milieux de culture, les seringues, objets en caoutchouc, etc. ; les instruments d'acier perdent de leur tranchant par ce traitement.

Un séjour de vingt minutes dans la vapeur à 115° suffit dans la presque totalité des cas pour obtenir une stérilisation complète; cependant, pour quelques substances, telles que les pommes de terre, par exemple, il est nécessaire d'atteindre la température de 120°.

Nous décrirons deux appareils de stérilisation par la vapeur sous pression.

1° **Autoclave Chamberland.** — L'autoclave est constitué par une chaudière cylindrique en cuivre dont les bords dressés s'adaptent par l'intermédiaire d'une rondelle de caoutchouc aux bords également dressés d'un couvercle en bronze. L'adhérence entre la chaudière et le couvercle est assurée par des boulons. Le couvercle porte un manomètre indiquant la pression en atmosphères et la température en degrés centigrades, une soupape de sûreté et un robinet de vapeur. A l'intérieur, un panier en toile de cuivre repose, par des pieds hauts de 5 à 6 centimètres, sur le fond de la chaudière. La chaudière elle-même est reçue dans un fourneau cylindrique en tôle ou en cuivre qui contient une couronne de becs de gaz.

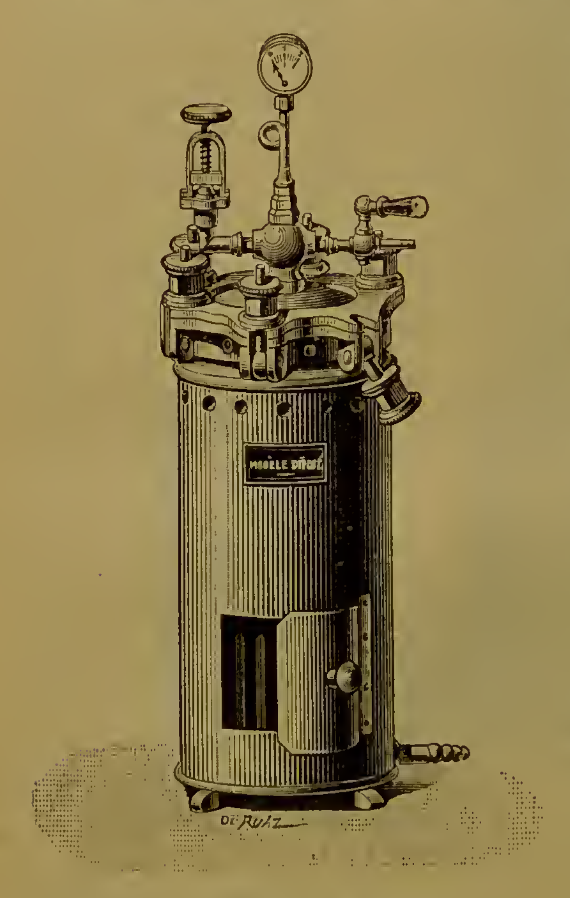


Fig. . — Autoclave Chamberland.

Fonctionnement. — *a.* Verser dans la chaudière une quantité d'eau (distillée de préférence pour éviter les encrassements) suffisante pour que le niveau arrive un peu au-dessous du fond du panier métallique. Disposer dans le panier les objets à stériliser.

b. Placer la rondelle de caoutchouc, poser le couvercle, relever et serrer les écrous. Le serrage doit s'opérer de préférence avec les mains; si on utilise pour le pratiquer la clef qui accompagne l'auto-

clave, on serre trop énergiquement, écrase la rondelle de caoutchouc et la met rapidement hors d'usage (1).

c. Ouvrir le robinet de vapeur du couvercle.

d. Allumer le gaz : présenter l'allumette au brûleur avant d'ouvrir le robinet de gaz, n'allumer qu'une seule des deux couronnes. Veiller à ce que les becs de gaz ne brûlent pas en dedans; si cela arrivait, éteindre et rallumer à nouveau.

e. L'eau étant portée à l'ébullition, la vapeur s'échappe par le robinet laissé ouvert; attendre quelques minutes jusqu'à ce que le jet de vapeur soit fort et sorte en sifflant.

Cette manœuvre a pour but de laisser échapper l'air contenu dans l'autoclave et dont la présence fausserait les indications du manomètre. Quoi qu'on fasse, il reste toujours, surtout avec les grands modèles, un peu d'air dans l'appareil; on pourrait chasser plus efficacement cet air en ouvrant et fermant plusieurs fois de suite le robinet, c'est-à-dire en opérant des décompressions, mais ce procédé est inapplicable à la stérilisation des milieux de cultures liquides : sous l'influence des décompressions brusques, les liquides des flacons entrent en ébullition, chassent les bouchons d'ouate et se répandent dans l'autoclave.

Le robinet de vapeur est alors fermé ; on voit l'aiguille du manomètre monter rapidement; quand elle a atteint la température désirée — d'ordinaire 115^{c} — on règle le gaz par tâtonnements, de façon à maintenir la température à ce degré pendant vingt minutes.

f. La stérilisation terminée, on éteint le gaz. L'aiguille du manomètre ne tarde pas à baisser; attendre qu'elle soit revenue au 0 du cadran (100^{c}), puis ouvrir le robinet de vapeur. Dès que la vapeur s'est échappée, desserrer les boulons et enlever le couvercle; sortir les objets et les porter à l'étuve sèche si l'ouate des bouchons est humide.

Il ne faut pas ouvrir le robinet avant que l'aiguille du manomètre soit revenue au zéro, pour éviter la projection du liquide des flacons dans l'autoclave sous l'influence de la décompression. Ne jamais desserrer les boulons avant d'avoir ouvert le robinet de vapeur, pour ne pas être brûlé par la vapeur qui s'échapperait lorsqu'on soulèverait le couvercle. Enfin, il ne faut pas attendre que l'appareil soit complètement refroidi pour enlever le couvercle, sans quoi la rondelle de caoutchouc adhérerait et rendrait l'ouverture difficile.

On peut, avec l'autoclave, stériliser à 100^{c}; il suffit pour cela de disposer l'appareil comme nous l'avons dit en *a*, *b*, *c*, *d*, puis de

(1) Dans l'intervalle des séances de stérilisation, il est bon de ne pas laisser la rondelle de caoutchouc sous le couvercle afin qu'elle ne s'écrase point ; mieux vaut la suspendre contre un mur. En tous cas, quand l'appareil est au repos, ne jamais serrer les boulons.

laisser le robinet de vapeur ouvert pendant toute la durée de l'opération (trente minutes) en réglant le brûleur de façon que l'aiguille ne quitte pas le zéro du cadran.

Ne jamais prolonger l'opération plus de quarante minutes à une heure, sans quoi la chaudière se trouverait à sec. Bien veiller à ce que la chaudière contienne toujours une quantité d'eau suffisante.

2° **Stérilisateur Vaillard et Besson.** — Dans les grands laboratoires où l'on consomme beaucoup de milieux de culture, et principalement pour la préparation des toxines destinées à l'immunisation des chevaux pour la sérothérapie, on est obligé d'avoir recours à des appareils de plus grandes dimensions que l'autoclave Chamberland. Dans ce cas, l'étuve Vaillard et Besson est généralement utilisée.

Cette étuve est constituée par une grande chaudière cylindrique à doubles parois (dimensions : haut. $0^{m},80$, diam. $0^{m},75$; ou haut. $0^{m},75$, diam. $0^{m},45$) ; dans l'espace central S on dispose sur des étagères les objets à stériliser ; la vapeur produite à la partie inférieure, dans le double fond V, passe entre les deux parois, arrive au contact des objets en traversant l'espace S de haut en bas et s'échappe par un clapet D qui règle son écoulement de telle sorte que la pression et par conséquent la température intérieures s'élèvent progressivement. Quand la température de 115° est atteinte, le fonctionnement du clapet permet automatiquement l'issue de la vapeur et empèche la température de s'élever davantage. La chaudière est munie en outre d'un robinet de niveau, d'un entonnoir latéral, par lequel on verse l'eau d'alimentation, d'un manomètre et d'un robinet à soupape. La stérilisation a lieu dans un courant de vapeur, condition qui entraîne l'expulsion totale de l'air sans qu'il soit pour cela besoin de recourir à des décompressions sur les inconvénients desquelles nous avons insisté.

Fonctionnement. — *a.* Disposer les objets à stériliser dans le cylindre intérieur de l'étuve. Mettre en place le couvercle et le fixer solidement au moyen des écrous.

b. Le robinet de l'entonnoir latéral étant ouvert, ainsi que le robinet de niveau (P), verser de l'eau dans la chaudière jusqu'à écoulement par le robinet de niveau. Fermer les deux robinets. Soulever le clapet D. Le robinet R reste fermé pendant toute l'opération.

c. Allumer le foyer (ce foyer est ordinairement alimenté au charbon).

d. L'eau entre en ébullition, la vapeur s'élève dans la double paroi, arrive dans la chambre de stérilisation et s'échappe par le tube VD. Quand le jet de vapeur est vigoureux, on abaisse le clapet D. La pression et la température montent dans l'intérieur de l'étuve,

on en suit la marche sur le manomètre. A mesure que la pression s'élève, l'échappement de la vapeur se fait plus vivement sous le clapet; dès que la température atteint 115°, la vapeur s'écoule da-

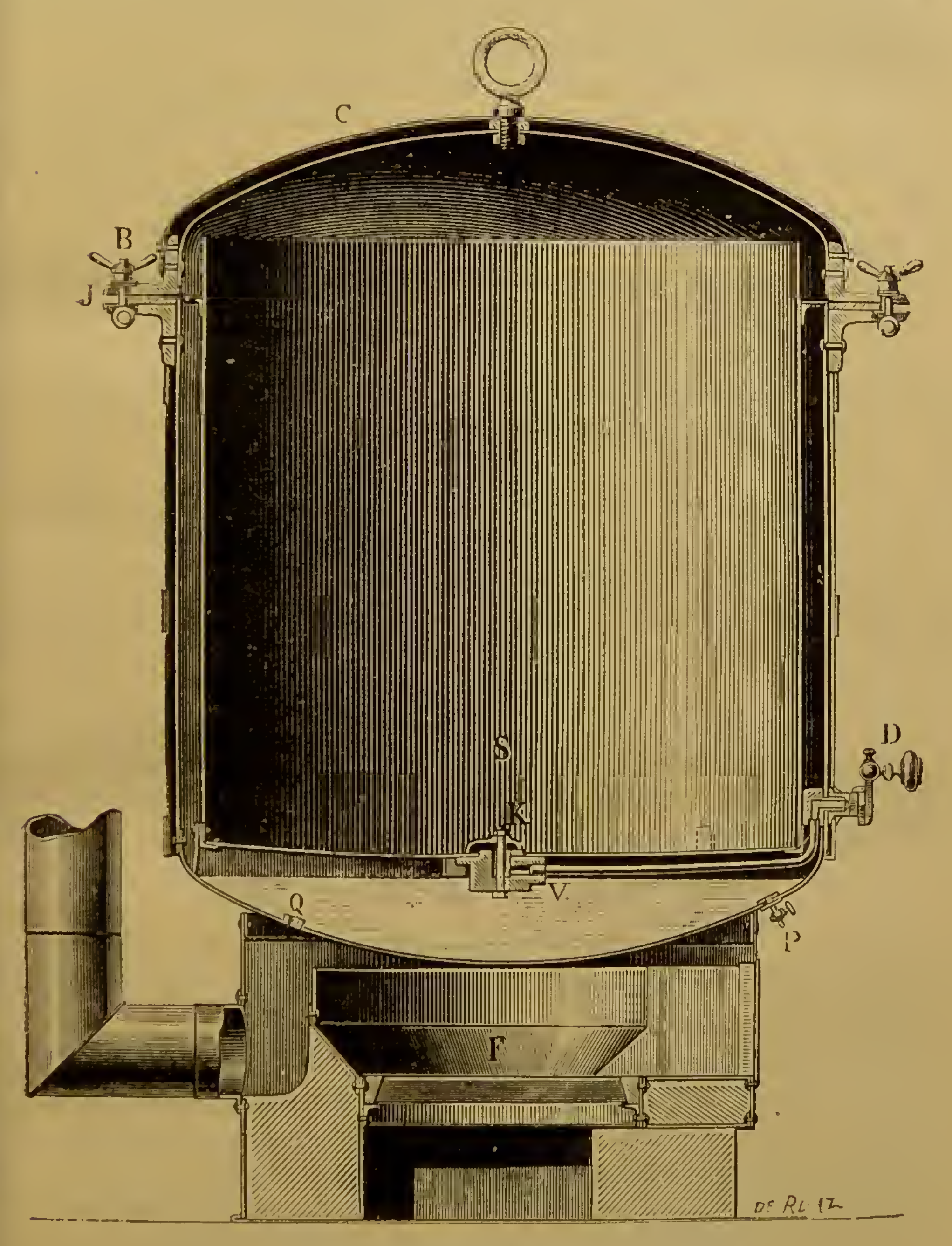


Fig. 6. — Appareil à stérilisation de Vaillard et Besson.

vantage et l'aiguille reste stationnaire; en aucun cas la pression ne peut dépasser le degré pour lequel est établi le clapet.

Le temps nécessaire à la stérilisation est compté à partir du moment où l'aiguille du manomètre indique 115°; prolonger alors l'opé-

ration pendant vingt minutes en soutenant le feu pour que l'aiguille du manomètre ne redescende pas.

e. La stérilisation terminée, retirer le feu, laisser refroidir l'étuve jusqu'au moment où l'aiguille du manomètre est au zéro; ouvrir le robinet R, puis enlever le couvercle de l'étuve.

Cet appareil permet également la stérilisation à 100°; pour cela on exécute les trois premiers temps comme précédemment, mais on n'abaisse pas le clapet D; la vapeur s'écoule en jet vigoureux pendant toute la durée de l'opération. On prolonge la stérilisation pendant trente minutes.

Une disposition spéciale du clapet permet également d'opérer à toutes les températures comprises entre 100° et 115°; on règle l'étuve à la température désirée, en éloignant plus ou moins la boule de la position perpendiculaire au clapet; plus la boule est distante de cette position, moins la température s'élèvera au-dessus de 100°.

C. — CHAUFFAGE DISCONTINU A BASSES TEMPÉRATURES.

Certains milieux de culture riches en albumine ne peuvent être portés à la température de l'ébullition sous peine de s'altérer notablement et de perdre leurs propriétés; tel est le cas du sérum, par exemple.

Pasteur a montré qu'on peut alors remplacer l'action rapide d'une haute température par l'action prolongée d'une température moins élevée (55° à 60°) : c'est la *pasteurisation*. Mais dans la pratique bactériologique, il faut combiner cette méthode avec celle du chauffage discontinu de Tyndall.

Voici comment on procède :

Le liquide à stériliser est réparti dans des ballons à long col, préalablement flambés, que l'on remplit aux trois quarts et que l'on ferme à la lampe d'émailleur.

Les ballons sont ensuite disposés dans un bain-marie dont on élève progressivement la température à 56°-58°. Un thermomètre plongeant dans le bain-marie permet de suivre à tout instant la marche de la température. Dès que le degré désiré est obtenu, on modère le brûleur, de manière à maintenir la température pendant une heure à ce degré. On laisse alors refroidir l'appareil sans en retirer les ballons.

On recommence l'opération tous les jours pendant une semaine entière; après quoi, la stérilisation peut être considérée comme terminée. Avant d'utiliser les liquides stérilisés, il est prudent de les laisser séjourner deux à trois jours dans l'étuve à 37° pour s'assurer de

leur pureté. Tout ballon dans lequel se produirait une culture devrait être rejeté.

Ainsi pratiquée cette opération est très difficile : on dépasse facilement la température maximale de 58°, les albumines se coagulent et le matériel de culture est perdu. Aussi opère-t-on d'ordinaire à l'aide d'un bain-marie spécial muni d'un régulateur avec lequel on est sûr de ne pas dépasser la température fixée.

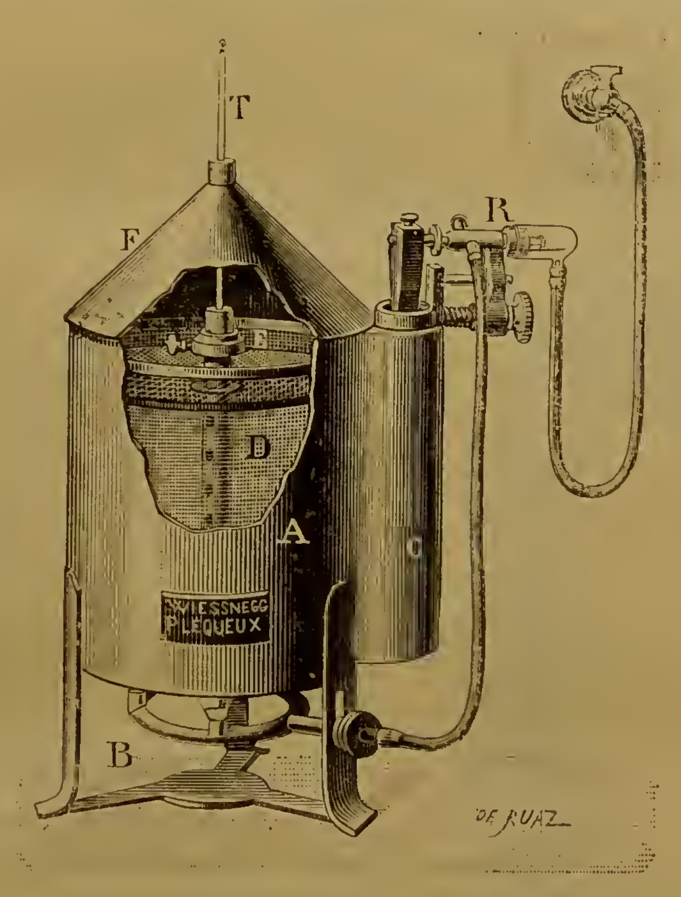


Fig. 7. — Bain-marie pour stériliser le sérum.

L'appareil construit par Wiesnegg se compose d'une chaudière A, disposée sur un brûleur à gaz, munie d'un couvercle F et d'un régulateur de Roux R placé dans un appendice C.

Fonctionnement. — La chaudière étant remplie d'eau aux trois quarts, les ballons y sont disposés et maintenus immergés par un disque en toile métallique. Placer le couvercle muni d'un thermomètre T. Allumer le gaz. Surveiller le thermomètre. Dès que la température désirée est atteinte, régler le régulateur de la manière indiquée plus loin (p. 75) et à partir de ce moment l'opération peut se poursuivre d'elle-même sans surveillance.

L'appareil est réglé une fois pour toutes, et les jours suivants on

n'a qu'à allumer le gaz sans se préoccuper du réglage, qui se fait automatiquement.

Avoir soin d'ajouter de temps en temps de l'eau dans le bain-marie.

La première fois qu'on utilise l'appareil, il est préférable de le faire fonctionner à blanc et de le régler avant d'y placer les ballons à stériliser; on évitera ainsi tout mécompte.

III. — FILTRATION.

Certains liquides ne peuvent supporter, sans altération profonde, une élévation même légère de température ; il faut alors recourir à la filtration pour débarrasser ces liquides des germes qu'ils contiennent ; pour cela on les fait passer dans des corps solides au travers de pores d'une ténuité extrême où sont retenus les germes. Pasteur, au début de ses recherches, utilisait dans ce but des plaques de plâtre ; aujourd'hui on emploie à peu près exclusivement dans les laboratoires le filtre en porcelaine poreuse de Chamberland.

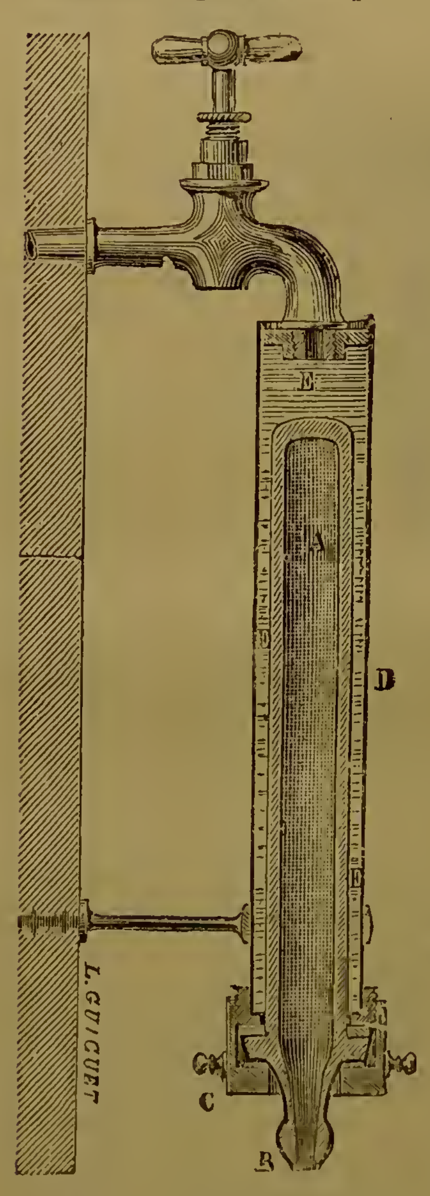


Fig. 8. — Filtre Chamberland.

Ce filtre se compose d'un tube ou *bougie* de porcelaine poreuse fermé à une de ses extrémités, ouvert à l'autre où il est muni d'une *tétine* B en porcelaine émaillée; le liquide à filtrer traverse la bougie de dehors en dedans et s'écoule stérile par la tétine. — Cette bougie peut être utilisée de diverses manières.

A. — Dans tous les laboratoires existe une de ces bougies disposée de façon à donner de l'eau stérile.

Pour cela la bougie est introduite dans un cylindre métallique D dont l'orifice inférieur (par lequel a pénétré la bougie) est fermé hermétiquement au moyen d'un écrou C et d'une rondelle de caoutchouc perforés pour laisser passer la tétine; l'orifice supérieur du cylindre est vissé sur le

robinet de la conduite d'eau; l'eau arrivant par ce robinet emplit la gaine métallique E de la bougie et s'écoule par la tétine B après avoir traversé la paroi de porcelaine poreuse en y abandonnant ses impuretés.

Remarques importantes. — 1° Avant de mettre la bougie en place, il faut s'assurer qu'elle n'est point fêlée, auquel cas elle laisserait passer les microbes et ne serait d'aucune utilité. Pour cela on plonge la bougie, jusqu'à la tétine exclusivement, dans une éprouvette pleine d'eau, et par cette

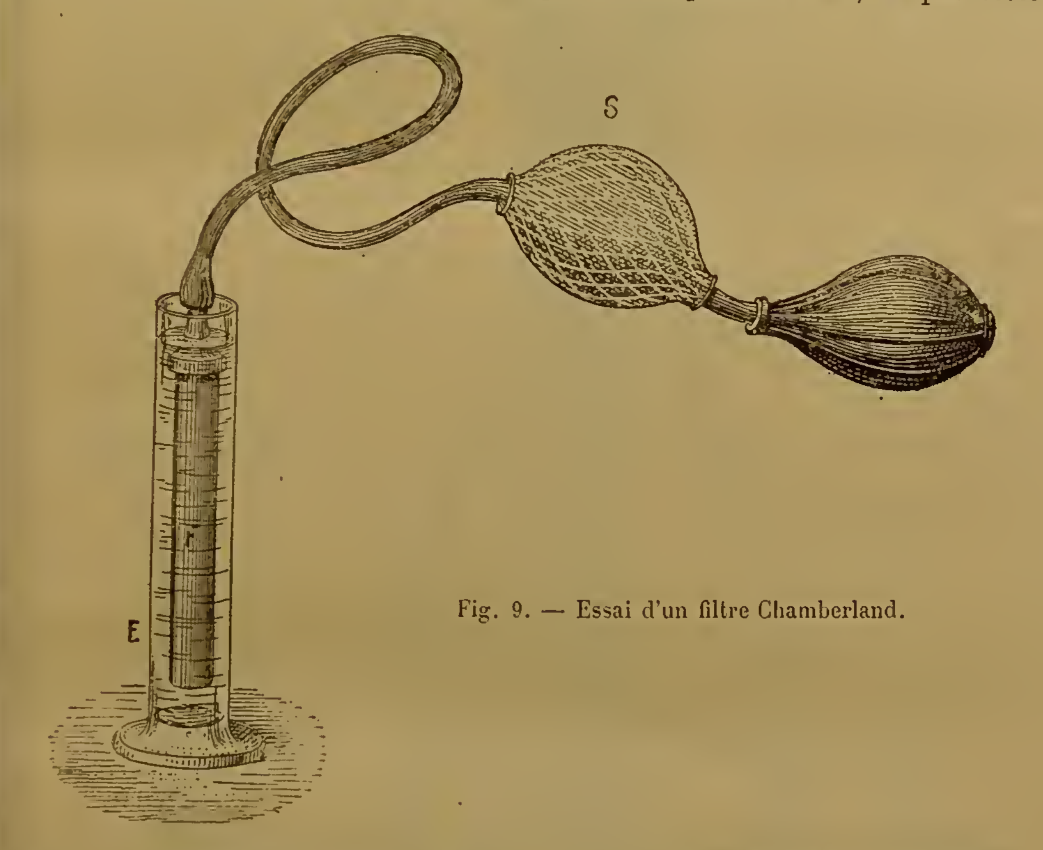


Fig. 9. — Essai d'un filtre Chamberland.

tétine, au moyen d'un tube en caoutchouc muni d'une poire à insufflation, on comprime de l'air à l'intérieur de la bougie : s'il existe une fissure restée invisible à l'œil, des bulles d'air s'échappent dans l'eau et sont facilement remarquées. Toute bougie fissurée doit être rejetée.

2° Il faut ensuite stériliser la bougie; pour cela, après l'essai précédent, la bougie étant encore mouillée, on obture la tétine avec un tampon d'ouate serré et on porte à l'autoclave pendant vingt minutes à 115°-120°. La bougie est alors montée dans sa gaine métallique, on retire le tampon d'ouate et l'appareil est prêt à fonctionner.

3° Quand on veut recueillir de l'eau stérile, l'appareil étant installé, il faut avoir soin de commencer par flamber fortement la tétine de la bougie à l'aide d'une lampe à alcool.

4° Par suite de leur fonctionnement, les bougies s'encrassent rapidement et laissent alors passer les germes; fréquemment il faut retirer la bougie de sa gaine, la frotter énergiquement avec une brosse de chiendent sous un courant d'eau, puis la stériliser comme il a été dit plus haut.

5° Après un usage prolongé, les pores de la bougie s'obstruent et la filtration devient lente; il faut régénérer le filtre : pour cela il existe

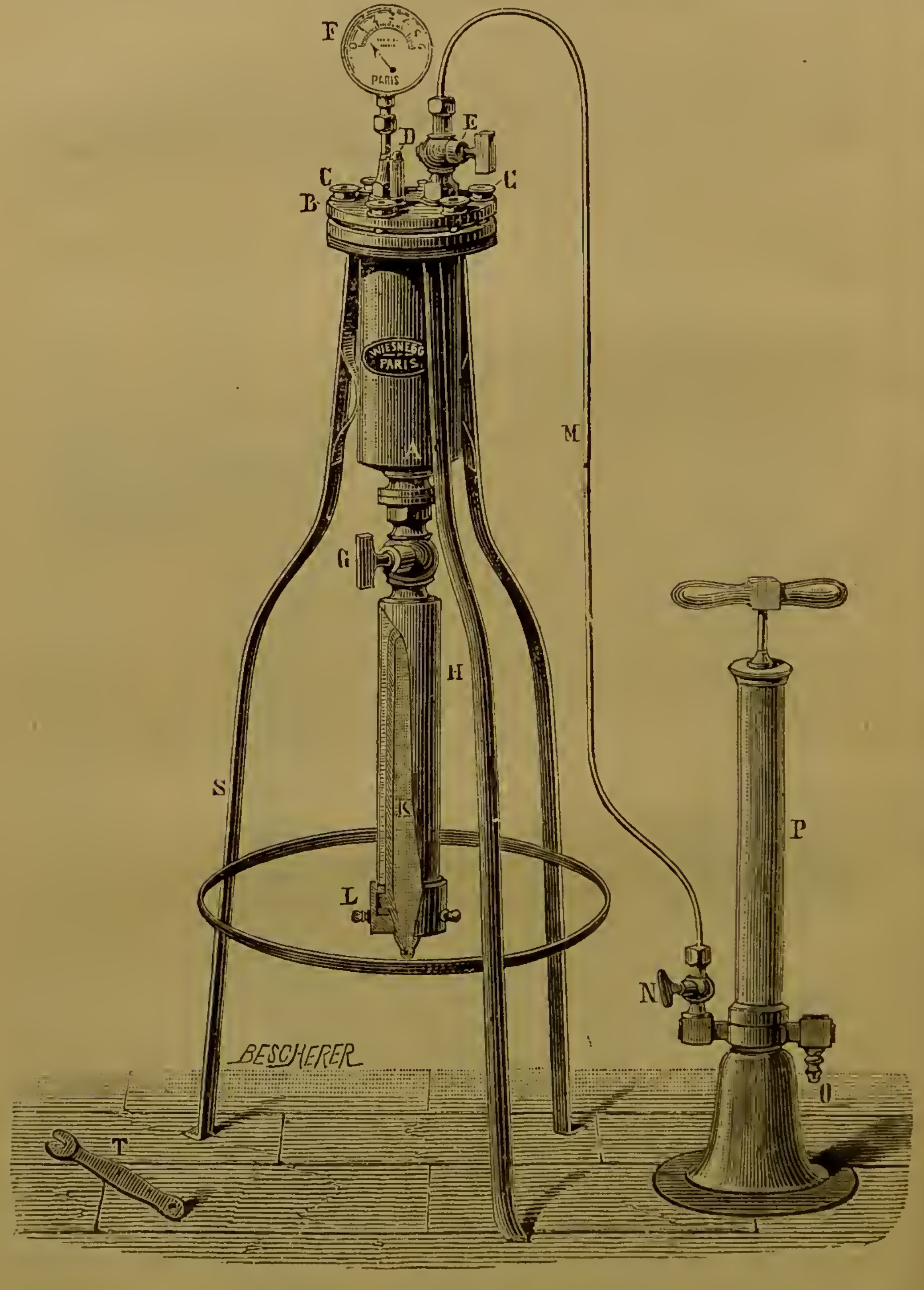


Fig. 10. — Filtre à pression graduée.

plusieurs procédés : *a*) on porte la bougie à l'autoclave à 120c et on opère plusieurs décompressions successives ; ce procédé, excellent en ce qu'il ne

compromet pas l'intégrité de la bougie, ne donne qu'une régénération relative; *b*) après avoir bien desséché la bougie, on la porte au rouge dans la flamme d'un brûleur à gaz ; on fissure fréquemment la bougie par ce procédé ; *c*) il vaut mieux chauffer la bougie au rouge dans un four à incinérations (quand la bougie a été régénérée par ces deux derniers procédés, il faut l'essayer à nouveau pour s'assurer qu'elle ne s'est point fissurée pendant l'opération) ; *d*) on peut enfin régénérer la bougie par l'emploi successif du permanganate de potasse et du bisulfite de soude (procédé Guinochet) ; on fait traverser successivement la bougie par une solution de permanganate de potasse à 5 p. 1000 et une solution de bisulfite de soude à 1/20; ce procédé est inférieur aux précédents.

6° Toutes les fois qu'une bougie a servi à filtrer une culture d'un microbe pathogène, elle doit immédiatement être portée à l'autoclave à 120°.

B. — On peut encore utiliser la bougie pour filtrer un milieu destiné à la culture ou séparer une culture de ses microbes.

Plusieurs dispositifs peuvent être adoptés, mais toujours la filtration doit se faire sous pression, soit qu'on comprime le liquide à stériliser, soit qu'on aspire le filtrat au sortir de la bougie.

Compression. — Le procédé le plus ancien consiste à placer le liquide à filtrer dans un réservoir en cuivre épais A, relié à une bougie et à l'y comprimer au moyen d'une pompe de Gay-Lussac.

Le liquide est versé dans l'orifice D, le robinet G étant fermé ; le cylindre rempli à moitié, on visse le tampon obturateur en D, le robinet E est ouvert et on comprime l'air au-dessus du liquide à l'aide de la pompe P. Un manomètre F indique la pression à l'intérieur de l'appareil. La pression désirée, ordinairement deux à trois atmosphères, étant atteinte, on ferme E et on ouvre progressivement G, le liquide passe en H dans un filtre Chamberland disposé comme celui décrit plus haut, traverse la bougie et sort par la tétine où on le recueille purement.



Fig. 11. — Dispositif pour recueillir le liquide filtré au sortir de la bougie.

Le meilleur procédé pour recueillir le liquide au sortir du filtre consiste à munir la tétine d'un tube de caoutchouc de quelques centimètres de longueur, terminé par un ajutage en verre. La bougie est stérilisée munie de cet appendice enveloppé dans un morceau de papier filtre. Au moment du besoin, la bougie est mise en place, puis on débarrasse l'ajutage en verre du papier qui l'entoure et on le fait pénétrer à travers le capuchon de papier dont est couvert l'orifice du flacon stérilisé où l'on doit recueillir le liquide filtré. Si le flacon est bouché à l'ouate, on fait passer l'ajutage entre le bouchon d'ouate et la paroi du goulot.

Cette méthode nécessite un appareil dispendieux; elle s'applique à la filtration des liquides visqueux.

Aspiration. — 1° **Procédé de choix.** — Il est souvent préférable de recourir à la *filtration par aspiration*; nous recommandons le procédé suivant, employé depuis longtemps au laboratoire de M. le professeur Vaillard (fig. 12).

La tétine d'une bougie est munie d'un tube B de caoutchouc à parois épaisses (tube à vide); l'extrémité libre de ce tube reçoit un ajutage en verre courbé à angle droit et qui s'engage dans l'un des deux trous d'un bouchon de caoutchouc. Ce bouchon (n° 7 ou 8) s'adapte sur un flacon en verre blanc A d'une contenance de 1 à 2 litres, suivant la quantité de liquide à filtrer, et à parois épaisses (ne jamais

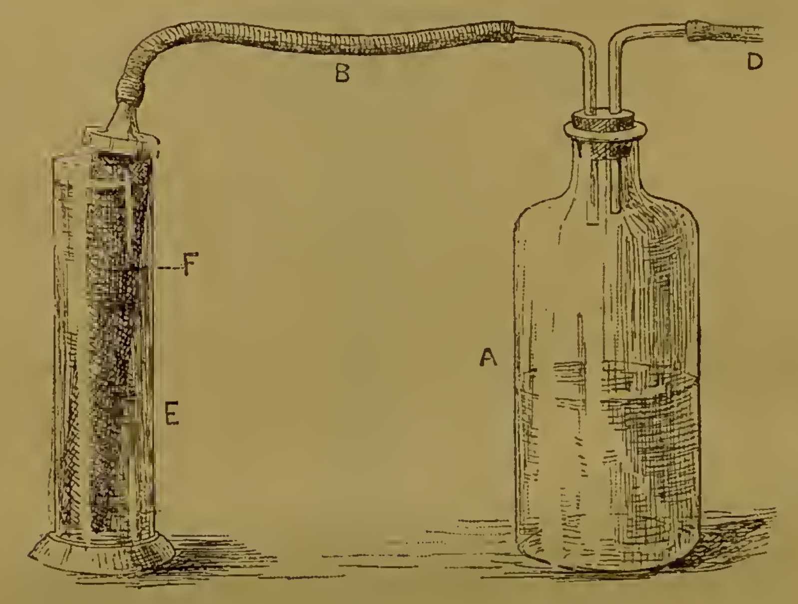


Fig. 12. — Appareil pour filtrer dans le vide.

employer de matras dont les parois fragiles céderaient sous la pression atmosphérique au cours de l'opération). Le second trou du bouchon reçoit un tube de verre courbé à angle droit, D, dont la branche verticale descend de quelques centimètres dans le flacon, et dont la branche horizontale porte entre deux étranglements un tampon assez serré d'ouate.

Le bouchon étant bien enfoncé dans le goulot du tube, on porte tout l'appareil dans l'autoclave; on chauffe lentement et on maintient vingt minutes la température de 120°. Après refroidissement on assure l'adhérence du bouchon et du goulot du flacon et l'appareil est prêt à fonctionner.

On place la bougie dans une éprouvette de verre E, de dimensions un peu supérieures aux siennes propres, et l'on verse dans cette

éprouvette le liquide à filtrer. — On relie alors le tube D à la trompe à eau, on fait le vide, le liquide aspiré traverse la bougie et arrive dans le flacon.

L'opération terminée, on arrête la trompe à eau, on sépare l'ajutage D du tube qui le relie avec la trompe (la rentrée d'air dans le flacon se fait au travers du tampon d'ouate dont est muni l'ajutage D). On flambe ensuite le col du flacon et on substitue au bouchon qui a servi à la filtration, soit un tampon d'ouate préalablement stérilisé, soit un bouchon répartiteur disposé comme nous le dirons plus bas. Le liquide stérilisé peut se conserver indéfiniment dans le flacon à l'état de pureté.

Dans la bougie il reste toujours un peu de liquide; on peut le recueillir en séparant la tétine du tube de caoutchouc et aspirant le liquide au moyen

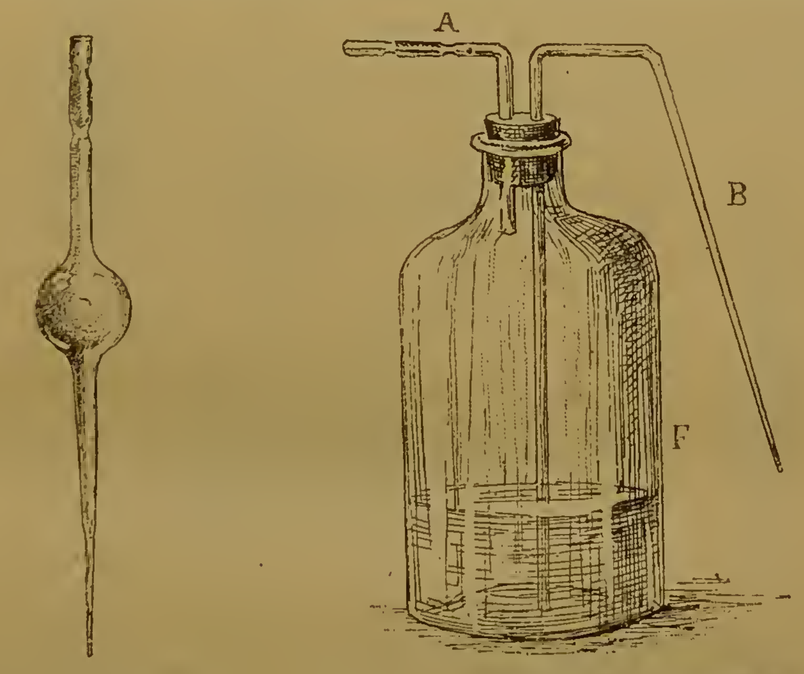


Fig. 13. — Pipette à boule.

Fig. 14. — Dispositif pour la manutention des filtrats.

d'une longue pipette à boule (fig. 13) préparée comme nous le dirons plus loin et flambée.

Préparation du bouchon répartiteur. — Pour utiliser le filtrat obtenu, il faut pouvoir l'extraire du flacon sans qu'il soit contaminé par les germes de l'air; pour cela on substitue au bouchon qui a servi à la filtration un bouchon préparé comme il suit :

On prend un bouchon de caoutchouc à deux trous, de même diamètre que le précédent; un trou reçoit un tube de verre A coudé à angle droit, portant dans sa branche horizontale une bourre

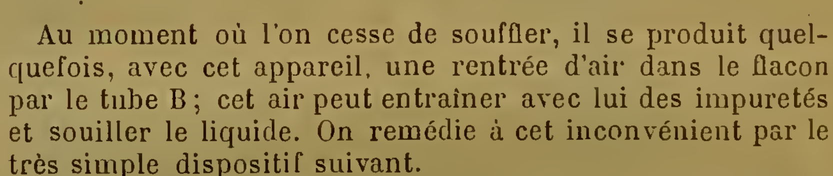
d'ouate entre deux étranglements, et dépassant de quelques centimètres la partie inférieure du bouchon. Le second trou donne passage à un autre tube B recourbé en U ouvert, dont une branche descend jusqu'au fond du flacon et dont la deuxième extérieure est étirée et fermée à la flamme. Le bouchon ainsi préparé est enveloppé de papier filtre et stérilisé à l'autoclave à 120°.

Au moment de l'appliquer sur le flacon, on flambe le col de celui-ci, puis on déplie le papier qui entoure le bouchon répartiteur, et on saisit ce bouchon par sa partie supérieure avec la main gauche. La main droite restée libre débarrasse le flacon de son premier bouchon, et rapidement celui-ci est remplacé par le bouchon répartiteur. Cette opération doit se faire très vite, pour éviter la chute des poussières atmosphériques dans le flacon ; le bouchon et le tube de verre plongeant dans le flacon ne doivent avoir aucun contact avec les objets extérieurs.

Pour extraire le liquide du flacon il suffit maintenant d'adapter une poire en caoutchouc à la tubulure A, de flamber la partie effilée du tube B et d'en casser l'extrémité avec une pince flambée : quelques coups de poire amènent l'écoulement du liquide. Quand on a extrait une quantité suffisante, on ferme le tube B à la lampe, ce qui permet de conserver le liquide restant dans le flacon à l'abri de l'air.



Fig. 15. — Obturation du tube répartiteur.



Au moment où l'on cesse de souffler, il se produit quelquefois, avec cet appareil, une rentrée d'air dans le flacon par le tube B ; cet air peut entraîner avec lui des impuretés et souiller le liquide. On remédie à cet inconvénient par le très simple dispositif suivant.

La branche extérieure du tube B est, avant la stérilisation, coupée vers sa partie moyenne. On rejoint les deux fragments *b* et *c* au moyen d'un tube en caoutchouc rouge long de quelques centimètres et dans lequel on introduit à frottement une baguette de verre de 1 à 2 centimètres de longueur (fig. 15). A l'état de repos, la baguette obture complètement le tube en caoutchouc et s'oppose à toute communication avec l'extérieur; mais vient-on à pincer latéralement, entre le pouce et l'index, le tube de caoutchouc, il en résulte la formation d'un petit canal par lequel passe le liquide. Pour se servir de l'appareil, on opère ainsi qu'il suit :

Le tube effilé étant flambé, son extrémité est cassée, on donne quelques coups de poire, puis on pince le tube de caoutchouc, le liquide s'écoule. Veut-on arrêter l'écoulement, on relâche d'abord le tube de caoutchouc : le liquide cesse de couler, toute communication avec l'extérieur est interrompue, alors seulement on supprime la pression, on sépare de l'appareil la poire de caoutchouc et ferme à la lampe la pointe effilée.

2° **L'appareil à filtration de Martin** (fig. 16) se compose d'un cylindre métallique B, analogue à celui que nous avons décrit à la page 14, à la partie supérieure duquel on visse un entonnoir métallique à robinet D. Le liquide versé dans cet entonnoir pénètre dans

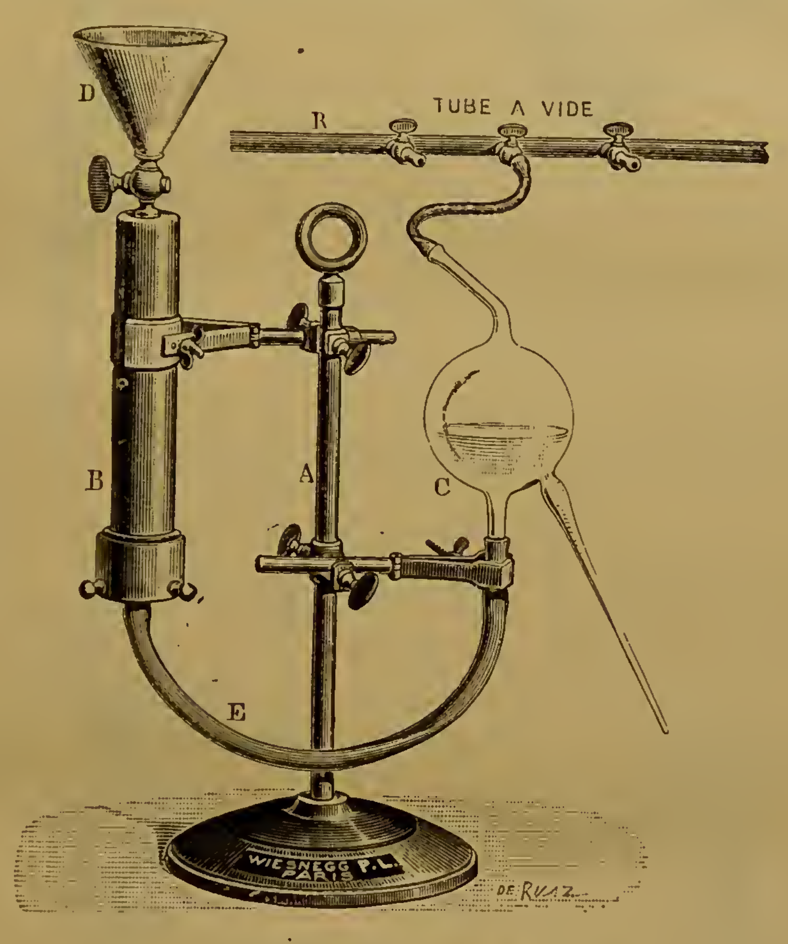


Fig. 16. — Appareil à filtration de L. Martin.

la gaine métallique et traverse la bougie qui y est contenue pour arriver, par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc E, dans le ballon C où l'on fait le vide au moyen de la trompe à eau. Une tubulure effilée, maintenue fermée pendant l'opération, permettra ultérieurement de répartir le liquide dans des tubes ou fioles flambés.

La tubulure supérieure du ballon C, par laquelle on fait le vide, doit être munie d'un tampon de ouate que l'on a omis de représenter dans la figure ci-jointe. Toutes les pièces de l'appareil doivent être stérilisées avant la filtration.

Cet appareil ne présente aucun avantage sur le précédent; il a en revanche l'inconvénient de coûter fort cher.

3° Enfin, quand on veut filtrer une très petite quantité de liquide,

on peut utiliser une petite bougie à parois minces, longue seule-

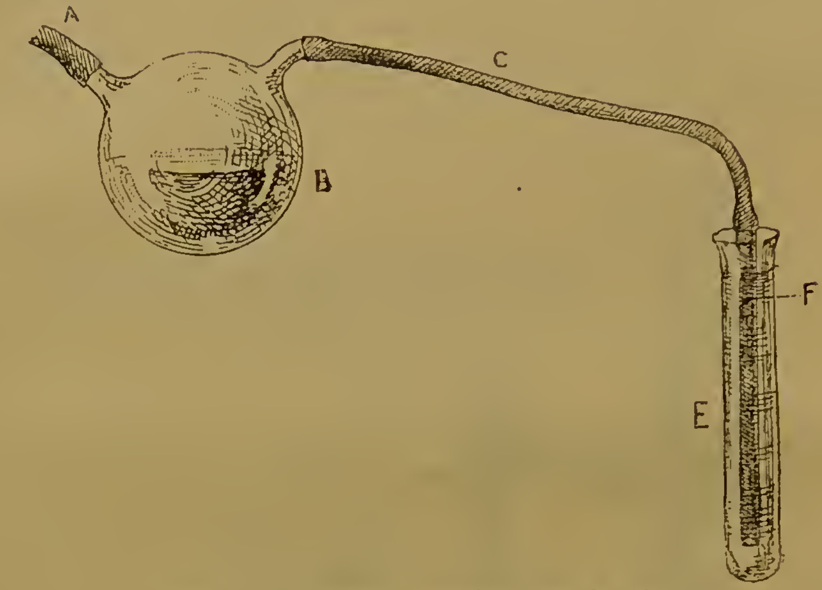


Fig. 17. — Appareil pour filtrer dans le vide.

Fig. 18. — Carafe de Duclaux pour filtrer dans le vide.

Fig. 19. — Filtre de Kitasato.

ment de 12 à 15 centimètres et du modèle de celles qui ont été employées les premières dans le laboratoire de Pasteur.

a. L'appareil peut être disposé comme le représente la figure 17; la bougie plonge dans une petite éprouvette où se trouve le liquide à filtrer; un tube en caoutchouc, fortement fixé à l'aide d'une ligature élastique sur l'extrémité supérieure de la bougie, relie celle-ci à un petit ballon B à deux tubulures. A la tubulure A, munie d'un tampon d'ouate, on adapte soit la trompe à eau, soit une petite pompe aspirante du modèle de celle de l'appareil Potain. Stériliser l'appareil à l'autoclave avant de s'en servir.

b. La bougie peut encore être adaptée dans un ballon à trois tubulures comme dans la figure 18. Pour cela le pourtour de l'extrémité supérieure de la bougie est garni d'un peu d'ouate, puis on fait pénétrer la bougie à frottement dans la tubulure supérieure; on ferme la tubulure D et on garnit d'un tampon d'ouate la tubulure B. Après stérilisation à l'autoclave, on verse sur l'ouate, en F, un peu de cire Golaz liquéfiée, pour rendre le joint étanche. La tubulure B étant réunie à la trompe à eau, le liquide à stériliser, versé en E, traverse la bougie et se collecte dans le ballon; pour répartir le filtrat, il suffit de briser la pointe D et de souffler par B (Duclaux).

c. Le filtre de Kitasato (fig. 19) n'est qu'une modification de cet appareil.

Règles générales. — En résumé, dans la stérilisation par filtration deux règles sont à observer :

1° *N'opérer qu'avec un filtre contrôlé, ne laissant passer aucun germe, et préalablement stérilisé.*

2° *Maintenir le liquide filtré à l'abri de toute souillure.*

IV. — STÉRILISATION PAR LES ANTISEPTIQUES.

Ce procédé de stérilisation est peu employé en technique bactériologique, car, non seulement il détruit les microbes contenus dans le milieu que l'on se propose de stériliser, mais il rend encore ce milieu impropre à des cultures ultérieures : la dose d'un antiseptique nécessaire pour détruire les germes dans un milieu est toujours beaucoup supérieure à celle qui suffit pour empêcher le développement de nouveaux germes apportés dans ce milieu.

1° On utilise les antiseptiques pour stériliser les cloches et cristallisoirs devant contenir des appareils de culture sans cependant être en contact direct avec les cultures; dans ce cas il faut avoir soin d'employer des antiseptiques fixes, n'émettant pas de vapeurs qui, en venant au contact des germes, empêcheraient leur développement.

On emploie d'ordinaire la *solution de sublimé au* 1/1000e. Cette solution de sublimé peut être préparée avec de l'eau ordinaire, mais

il faut alors ajouter à l'eau une petite quantité d'un des acides tartrique, acétique ou chlorhydrique, pour que le sublimé ne soit pas précipité par les sels en solution dans l'eau.

De plus, l'addition d'un acide à la solution de sublimé augmente beaucoup son pouvoir antiseptique et empêche le sel de mercure d'être précipité au contact des liquides organiques, ordinairement de réaction alcaline.

Furbringer conseille la solution suivante :

Eau	1000 grammes.
Chlorure mercurique	1 gramme.
Acide acétique cristallisable	0gr,50

Il faut donner la préférence à la formule de Laplace, beaucoup plus active :

Eau	1000 grammes.
Chlorure mercurique	1 gramme.
Acide chlorhydrique	5 grammes.

Cette solution sera couramment employée pour le lavage des mains, des cloches, etc. En avoir plusieurs litres préparés d'avance.

2° La solution de sublimé acide est aussi utilisée pour stériliser la surface cutanée quand, sur le vivant, on veut faire des prélèvements de pus, de sang, etc. (Voy. p. 177). Il faut avoir soin alors, la stérilisation terminée, de débarrasser le tégument de toute trace de l'antiseptique, au moyen de lavages à l'alcool, avant de faire le prélèvement, sans quoi les résultats des cultures seraient négatifs.

3° On utilise encore les antiseptiques quand on se propose d'empêcher la pullulation des germes dans un liquide filtré et ne devant plus servir de milieu de culture : on ajoute alors une petite quantité d'un antiseptique dépourvu d'action chimique sur les éléments que contient le liquide, par exemple de l'acide thymique, du camphre.

4° Enfin, on stérilise quelquefois à l'aide d'un antiseptique une culture dont on veut séparer les produits de sécrétion des microbes.

On emploie alors des antiseptiques volatils dont on pourra ensuite facilement débarrasser le liquide par évaporation, tels que chloroforme, essence de moutarde, etc.

CHAPITRE II

MILIEUX DE CULTURE

La culture des microbes constitue un des chapitres les plus importants de la technique bactériologique.

Les microbes, comme toutes les cellules vivantes, renferment de la matière organique azotée, de la matière non azotée et des sels minéraux. Il faudra donc leur fournir ces trois catégories de substances. De plus, toute cellule respire : les microbes ont besoin d'oxygène.

Mais, tandis que certains microbes, les *aérobies*, sont susceptibles, comme les êtres supérieurs, d'utiliser l'oxygène gazeux tel qu'il se trouve dans l'air, les autres, ou *anaérobies*, ne peuvent se développer au contact de l'oxygène libre et empruntent ce corps à une de ses combinaisons qu'ils décomposent à mesure de leurs besoins.

A ces deux catégories de microbes correspondent des modes de culture fort différents ; les aérobies doivent être cultivés dans des vases permettant le libre accès de l'air ; les anaérobies, au contraire, ne se développent que si on les préserve du contact de l'air, en les cultivant, soit dans le vide, soit en présence d'un gaz inerte.

Quoi qu'il en soit, les milieux de culture sont les mêmes pour ces deux sortes de microorganismes et doivent toujours contenir des matières azotées, des éléments ternaires et des sels. Beaucoup de microbes sont susceptibles de décomposer les combinaisons minérales de l'azote (azotates, etc.) et de transformer l'azote de ces sels en azote organique : dans un certain nombre de cas, on pourra cultiver les microbes dans des milieux purement minéraux auxquels on aura eu soin d'ajouter une petite quantité d'un hydrocarboné, de sucre par exemple.

Les substances nécessaires à la vie des microorganismes peuvent être fournies par des macérations, des bouillons de tissus animaux, des infusions végétales, ou enfin des solutions salines additionnées d'un hydrocarboné. Les milieux de culture peuvent être solides ou liquides.

Règles générales. — Tout milieu de culture doit :

1° Contenir les substances nécessaires au développement du microbe qu'on y ensemencera;

2° Avoir été préalablement stérilisé;

3° Être contenu dans des vases qui le mettent à l'abri de toute contamination par les germes extérieurs.

Vases de culture. — Ils sont très variés; nous les décrirons à mesure que nous en ferons usage; nous nous contenterons pour le moment de signaler les modèles les plus utilisés pour la culture des aérobies.

1° Les *tubes à essai* ordinaires, mais sans rebord à l'orifice, sont d'un usage constant. Ces tubes seront bouchés à l'ouate, comme nous l'avons expliqué plus haut.

2° Les *matras Pasteur*, petites fioles d'une contenance de 30 à 50 grammes, sont aussi très employés. Ces matras sont d'ordinaire

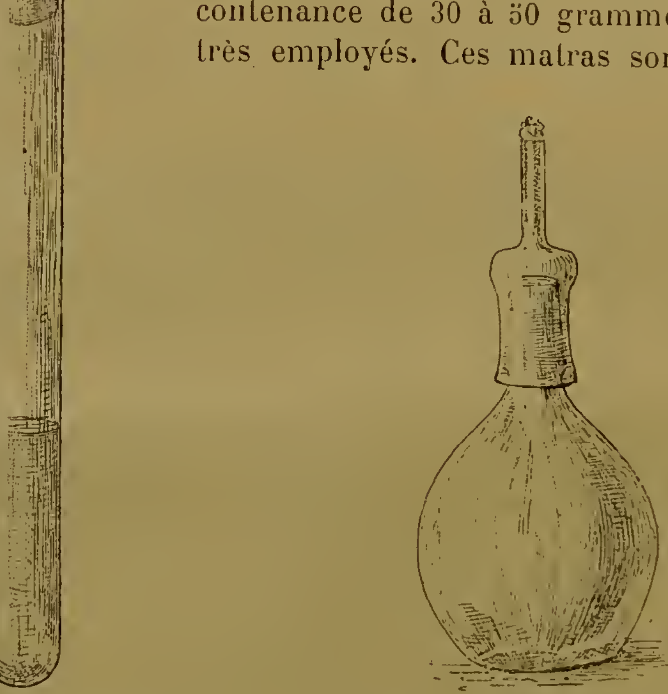


Fig. 20. — Tube pour culture bouché à l'ouate.

Fig. 21. — Matras Pasteur.

bouchés au moyen d'un bouchon tubulaire en verre, embrassant leur col rodé à l'émeri, et muni d'une cheminée étroite portant un tampon d'ouate. Ce mode de fermeture protège très efficacement le contenu du ballon contre les diverses causes de souillure, mais il a l'inconvénient d'être très fragile : le bouchon de verre éclate souvent quand on le flambe avant d'ouvrir le matras.

Il est préférable de coiffer simplement l'orifice du matras avec un

›tit capuchon de papier filtre (rouler une petite bande de papier ltre autour du col et en tortiller sur elle même la partie supérieure), ı plus simplement encore de boucher ces flacons à l'ouate comme ·s tubes à essai.

Capuchons de caoutchouc. — Le bouchon d'ouate ne préserve pas : contenu des tubes de l'évaporation; pour conserver certains ıilieux solides, tels que sérum, gélose, pomme de terre, etc., on əvra empêcher cette évaporation en coiffant les tubes, préalablement bouchés à l'ouate, avec un capuchon de caoutchouc. Mais ces ıpuchons maintiennent l'ouate humide : il faut les stériliser avant ·ur application, sans quoi les germes qu'ils apporteraient finiraient ır traverser l'ouate humide et souilleraient le contenu des tubes. ı les stérilise à l'autoclave à 115° ou en les trempant dans le ıblimé acide.

Il est encore plus simple, pour conserver les cultures de collection, e tremper l'extrémité des tubes bouchés à l'ouate dans de la paraf·ne fondue.

Passons maintenant à la préparation des milieux de culture.

I. — MILIEUX LIQUIDES.

A. — MILIEUX ANIMAUX.

Ils sont très variés; nous décrirons les principaux en prenant ɔmme type le bouillon de bœuf peptonisé, le plus fréquemment mployé.

BOUILLON DE BŒUF PEPTONISÉ.

Ce milieu est d'un usage fréquent; dans le cours de cet ouvrage ous le désignerons par le simple mot *bouillon*.

Préparation. — 1° Prendre 500 grammes de viande de bœuf, ıaigre, privée de tendons et d'aponévroses; la hacher menue, la faire ıacérer pendant quelques heures dans 1000 grammes d'eau froide.

2° Cuire le tout à feu doux dans une casserole émaillée, remuer ɔnstamment avec une spatule. Porter lentement à l'ébullition et rolonger celle-ci pendant dix minutes.

3° Jeter sur un torchon épais et propre, exprimer fortement le ·ésidu, recueillir le liquide qui s'écoule et le filtrer chaud sur un ltre en papier épais (Chardin ou Prat-Dumas) et mouillé afin de ›tenir la graisse.

4° Verser le bouillon filtré dans une casserole émaillée, y ajouter :

Peptone sèche (Chapoteaut ou Witte).	10 grammes,	soit 1 p. 100 de l'eau employée.
Sel marin........................	5 —	soit 0,5 p. 100 —
Phosphate de soude..............	Une pincée (environ 1 gramme).	

Porter à l'ébullition en agitant pour assurer la dissolution de la peptone.

5° Le liquide obtenu est fortement acide; il faut le neutraliser, les bactéries se développant de préférence en milieu neutre ou légèrement alcalin.

Pour cela, employer une solution de soude à 1/10, dont on verse, avec une pipette, de petites quantités dans le bouillon en ayant soin de vérifier fréquemment, avec le papier de tournesol, la réaction du liquide. On cesse d'ajouter de la soude dès que le papier rouge est très légèrement bleui par une goutte de bouillon porté à son contact avec un agitateur en verre. L'alcalinité doit être très peu prononcée.

Ce temps est le plus délicat de la préparation du bouillon; la quantité d'alcali à ajouter varie beaucoup avec les différentes viandes; aussi ne peut-on procéder que par tâtonnements. Ajouter très lentement la solution de soude, remuer avec soin la masse à chaque nouvelle addition. Quand on approche de la neutralisation, essayer le bouillon à la fois avec un papier rouge et un papier bleu de tournesol; il arrive un moment où une goutte de liquide ne fait virer aucun de ces deux papiers; il suffira alors d'ajouter une très petite quantité de soude pour avoir une alcalinité suffisante.

6° Le bouillon alcalinisé est versé dans un matras en verre, ou mieux dans une boîte à lait en tôle émaillée, du modèle universellement répandu, et on le porte à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes. Le liquide se trouble et il se précipite des grumeaux de phosphates terreux.

Le liquide retiré de l'autoclave est jeté chaud sur un filtre Chardin mouillé : les grumeaux sont retenus et le filtrat doit être absolument limpide.

Cette opération a pour but de débarrasser le bouillon de cet excès de phosphates terreux : si on omettait de la pratiquer, le bouillon se troublerait lors de la stérilisation.

7° Le liquide limpide obtenu est ramené au volume de 1000 centimètres cubes par addition d'eau distillée.

8° Le bouillon est alors terminé; il ne reste plus qu'à l'enfermer dans les vases de culture et à le stériliser.

a. Si on veut conserver le bouillon pour s'en servir plus tard seulement, on peut le verser pour la stérilisation dans un grand matras fermé à l'ouate ou dont on étire le col à la lampe. Au moment du besoin, on répartira le liquide nutritif dans les vases de culture suivant le procédé indiqué page 46.

b. Mieux vaut répartir immédiatement le bouillon dans les vases culture.

Pour cela, on prend des tubes à essai ou des matras Pasteur; on rse 10 à 15 centimètres cubes de bouillon par tube ou 25 centiètres par matras. Il faut dans cette opération se servir d'un petit tonnoir de verre pour ne pas mouiller l'orifice des tubes; le uillon desséché au contact du bouchon d'ouate ferait adhérer ce uchon et on ne pourrait par la suite ouvrir le tube que difficileent; cette précaution est encore plus importante quand on a afire à une substance solidifiable comme la gélose ou la gélatine.

Fermer les tubes ou flacons à l'ouate.

Porter ensuite les vases à l'autoclave dans un panier en toile étallique et stériliser à 115° pendant vingt minutes, en ayant soin e ne pas dépasser cette température et d'observer les règles xposées au chapitre I (1).

BOUILLON DE VEAU.

Opérer comme ci-dessus en remplaçant la viande de bœuf par 00 grammes de viande maigre de veau.

BOUILLON DE POULE.

Se prépare comme les précédents, mais avec 500 grammes de chair usculaire de poule; rejeter avec soin la peau, les tendons, les os, ans quoi le bouillon serait de consistance gélatineuse.

EAU DE VIANDE.

1° Prendre 500 grammes de viande maigre de bœuf, hachée. Verser essus 1000 grammes d'eau. Mettre à la glacière pendant une uit.

2° Le lendemain agiter le mélange, le passer sur un torchon, xprimer avec soin le résidu. Filtrer au papier Chardin le liquide btenu.

3° Porter le filtrat à l'ébullition après l'avoir additionné de grammes de sel marin.

4° Alcaliniser comme il a été dit pour le bouillon peptonisé.

5° Porter à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes.

6° Filtrer à chaud sur un filtre Chardin mouillé.

(1) Quelquefois, au sortir de l'autoclave, le bouillon présente un très léger louche qui disparait par le refroidissement.

7° Ramener à 1000 centimètres cubes par addition d'eau distillée.
8° Répartir dans des tubes et stériliser à 115°.

BOUILLON AU LIEBIG.

1° Dissoudre à feu doux 5 grammes d'extrait de viande Liebig dans 1000 grammes d'eau. Alcaliniser si besoin.

2° Porter à l'autoclave à 115°-117° pendant cinq minutes. Filtrer à chaud sur un filtre mouillé.

3° Répartir en tubes, stériliser à 115°.

Ce milieu peut être additionné de 10 grammes de peptone Chapoteaut et de 5 grammes de sel marin. Ajouter ces substances avant l'alcalinisation.

BOUILLON AU CIBILS.

Opérer comme pour le précédent en remplaçant le Liebig par 20 grammes d'extrait de Cibils.

Ce milieu, comme les précédents, est surtout employé dans les laboratoires allemands.

SOLUTION DE PEPTONE DE KOCH.

1° Dissoudre à chaud dans 1000 grammes d'eau 10 grammes de peptone Witte ou Chapoteaut et 5 grammes de sel marin.

Ne pas alcaliniser, la peptone étant suffisamment alcaline.

2° Porter à l'ébullition. Filtrer.

3° Répartir en tubes ou en ballons Pasteur. Stériliser à 115°.

PEPTO-GÈLO-SEL DE METCHNIKOFF.

1° Dissoudre à chaud dans 1000 grammes d'eau :

Peptone (Chapoteaut ou Vitte)	10	grammes.
Sel marin	5	—
Gélatine blanche extra	20	—

2° Alcaliniser très légèrement avec la solution de soude au 1/10.

3° Porter cinq minutes à l'autoclave à 115°. Filtrer sur papier Chardin.

4° Répartir; stériliser à 115°.

BOUILLON DE PEPTONE DE MIQUEL.

1° Faire dissoudre à feu doux dans un litre d'eau :

Peptone Chapoteaut	20	grammes.
Sel marin	5	—

2° Ajouter $0^{gr},10$ de cendres de bois. Faire bouillir. Filtrer au chardin.

3° Le liquide est d'ordinaire fortement alcalin; le neutraliser avec une solution d'acide tartrique ajoutée très prudemment en surveillant la réaction à l'aide du papier de tournesol.

4° Faire bouillir pendant cinq minutes. Filtrer. Ramener à 1000 centimètres cubes.

5° Répartir en tubes; stériliser à 115°.

BOUILLON DE THYMUS (BRIEGER).

1° Recueillir aussitôt après la mort des animaux deux ou trois thymus de veau; les hacher menu et ajouter à la pulpe obtenue un poids égal d'eau distillée. Mêler, laisser macérer douze heures.

2° Filtrer sur une gaze, exprimer le résidu. La sérosité trouble et visqueuse obtenue est additionnée de son poids d'eau.

3° Au liquide ajouter une solution de carbonate de soude à 1/10 jusqu'à réaction faiblement alcaline.

4° Porter à 100° pendant quinze minutes dans l'autoclave ou la marmite de Koch (une température supérieure altérerait le milieu). Filtrer sur un linge fin.

5° Répartir en tubes préalablement flambés au four Pasteur. Stériliser à 100° pendant quinze minutes et recommencer la stérilisation le lendemain.

Certains microbes, tels que le V. du choléra, ne se développent bien dans ce milieu que si on a soin, au moment de l'utiliser, d'ajouter 5 à 6 volumes d'eau stérile au contenu des tubes.

BOUILLON GLYCÉRINÉ.

Au bouillon de bœuf peptonisé on ajoute, au temps 7 de la préparation, avant la répartition en tubes, 5 p. 100, soit 50 grammes par litre de glycérine pure.

Ce bouillon peut encore être préparé avec le bouillon glucosé obtenu comme il est dit ci-dessous.

BOUILLONS SUCRÉS.

Au bouillon de bœuf on ajoute, au temps 4, en même temps que la peptone et le sel :

Glucose............	2 à 4 p. 100..........	Bouillon glucosé.
Lactose.............	—	— lactosé.

ou

Mannite.............	2 à 4 p. 100	Bouillon mannité.

ou

Sucre de canne......	—	....	— sucré.

Terminer l'opération comme pour le bouillon ordinaire.

BOUILLON CARBONATÉ.

On prépare un bouillon sucré, lactosé, mannité ou glucosé, auquel on ajoute avant la répartition en tubes (temps 7) 2 p. 100 de carbonate de chaux.

Le bouillon lactosé-carbonaté est le plus ordinairement employé. Quand on cultive dans ces bouillons un microbe attaquant les sucres, les acides produits par la fermentation mettent en liberté l'acide carbonique du sel de chaux et il se manifeste dans le tube une vive effervescence.

LAIT.

Le lait peut être utilisé de plusieurs façons comme milieu de culture :

A. — Répartir du lait frais, de réaction alcaline, dans des tubes à essai (15 à 20 centimètres par tube).

Boucher à l'ouate.

Stériliser vingt minutes à 115°.

Ce procédé est de beaucoup le plus simple ; il suffit pour la grande majorité des recherches ; c'est celui que nous emploierons d'ordinaire au cours de cet ouvrage.

B. — On peut se proposer d'éviter au lait la stérilisation à 115°, cette température modifiant légèrement les qualités du liquide.

Dans ce cas, après avoir lavé soigneusement le pis de la vache et s'être asepsié les mains, l'opérateur recueille le lait, à mesure qu'il sort du pis sous l'influence de la traite, dans les ballons stérilisés.

Les ballons sont remplis aux trois quarts, fermés à la lampe et chauffés pendant huit jours au bain-marie entre 60° et 65°, comme il est dit page 13.

La stérilisation terminée, le lait peut être réparti dans des tubes flambés, comme il sera dit à propos du sérum (p. 45).

C. — Duclaux a recommandé le procédé suivant, d'exécution délicate, mais qui permet d'obtenir du lait stérile sans avoir recours au chauffage :

1° Préparer des tubes à essai, boucher à l'ouate et flamber au four Pasteur ;

2° Le pis de la vache est lavé et brossé au savon, rincé à l'eau stérile ; les mains de l'opérateur sont asepsiées ;

3° On commence la traite, les premiers jets de lait en s'écoulant lavent la paroi des canaux excréteurs ;

4° Au bout d'un instant de traite, un aide flambe l'orifice d'un tube stérile, en retire le bouchon d'ouate et présente cet orifice au jet du lait qui sort du trayon. Le tube doit être présenté très près du trayon, sans le toucher cependant. Le tube étant à moitié plein, l'aide replace le bouchon d'ouate ;

5° Préparer ainsi un certain nombre de tubes et les mettre en observation pendant quarante-huit heures à l'étuve à 30° avant de les utiliser. Malgré toutes les précautions prises un certain nombre de ces tubes sont toujours contaminés ; rejeter tout tube dont le lait se coagule, ou dans le contenu duquel l'examen microscopique montrerait la présence de bactéries.

URINE.

L'urine a été très employée comme milieu de culture, au début des recherches bactériologiques ; son emploi est à peu près délaissé aujourd'hui.

A. — 1° De l'urine fraîche est portée à l'ébullition ;

2° Si la réaction est devenue fortement alcaline par l'ébullition, on ajoute un peu d'une solution d'acide tartrique, sous le contrôle du papier de tournesol ;

3° Filtrer, répartir en tubes, stériliser à 115°.

Ce procédé modifie sensiblement la composition de l'urine, l'urée en solution étant altérée par la température de l'ébullition.

B. — Ce second procédé, plus compliqué que le précédent, donne immédiatement de l'urine stérile sans chauffage :

1° On prend une sonde de caoutchouc rouge, on en coiffe l'extrémité supérieure avec un capuchon de papier filtré, puis on enveloppe avec soin la sonde dans plusieurs doubles de papier et on la stérilise à 115° pendant vingt minutes. Le paquet sorti de l'autoclave est séché rapidement dans une étuve sèche ;

2° Un homme étant dans le décubitus dorsal on lave avec soin le gland et le méat avec une solution de sublimé au millième, on essuie avec une compresse stérilisée à l'autoclave, puis on entoure la verge avec une compresse également stérilisée. Les mains de l'opérateur sont asepsiées ;

3° Le papier qui enveloppe la sonde est déplié, la sonde est saisie par son extrémité supérieure et on trempe dans de l'huile stérilisée à 115° son extrémité inférieure ;

4° La sonde, reposée sur son papier d'enveloppe, est approchée du

méat; la main droite de l'opérateur la saisit vers sa partie moyenne et l'engage dans le méat; la sonde est poussée dans le canal, son extrémité supérieure glissant sur le papier que maintient un aide ;

5° Aux approches de la vessie l'opérateur serre fortement la sonde entre le pouce et l'index, puis le sphincter est franchi ;

6° L'aide flambe le col d'une fiole préalablement flambée au four, en enlève le bouchon d'ouate, puis en présente l'orifice à l'extrémité de la sonde dont il a ôté le capuchon de papier ;

7° L'opérateur desserre les doigts et l'urine s'écoule dans le flacon ; celui-ci étant aux trois quarts plein, l'opérateur arrête la sortie de l'urine en comprimant la sonde, l'aide flambe le col de la fiole et y replace le tampon d'ouate qu'il a tenu de la main gauche pendant le remplissage ;

8° L'urine est répartie en tubes par le procédé indiqué à propos du sérum (p. 46). Ces tubes sont mis en observation à l'étuve à 30° pendant trente-six à quarante-huit heures, on rejetterait ceux dont le contenu aurait troublé.

SÉRUM.

Le sérum, obtenu par la coagulation spontanée du sang ou provenant des épanchements pleurétiques, est quelquefois employé comme milieu de culture liquide, mais il est beaucoup plus souvent utilisé après solidification par l'action de la chaleur.

Nous étudierons la technique de la préparation du sérum à propos des milieux solides.

B. — MILIEUX VÉGÉTAUX.

Les infusions végétales sont peu fréquemment utilisées en technique microbiologique ; nous ne citerons que les principales d'entre elles.

EAU DE LEVURE.

a. Délayer 100 grammes de levure dans 1 000 grammes d'eau ; porter à l'ébullition ; filtrer au papier Chardin.

Le filtrat légèrement acide est réparti en tubes ou matras Pasteur et stérilisé à 115°.

b. On peut alcaliniser légèrement l'eau de levure ; ajouter alors avec précaution de la solution de soude au dixième avant de filtrer le liquide.

c. On peut, avant la filtration, additionner l'eau de levure de 5 p. 100 de sucre, ce qui augmente ses propriétés nutritives.

d. Dans le cas où le liquide resterait louche après la filtration on y ajouterait un peu d'acide phosphorique officinal (1), puis de l'eau de chaux en quantité suffisante pour ramener à une réaction faiblement alcaline. Porter alors cinq minutes à 115°-116°. Filtrer. Répartir en tubes. Stériliser à 115°.

EAU DE MALT.

1° 100 grammes d'orge germée (malt) sont broyés, puis délayés dans 1 000 grammes d'eau ;

2° Maintenir pendant une heure le mélange à 55°-58° : la diastase transforme l'amidon en maltose et on obtient un véritable moût de bière (ne pas dépasser 58° dans cette préparation, sans quoi la diastase serait détruite);

3° Porter ensuite à l'ébullition. Filtrer sur papier Chardin;

4° Répartir; stériliser à 115°.

EAU DE TOURAILLONS.

Les touraillons sont constitués par les plantules de l'orge germée.

Dans 1 000 grammes d'eau, faire macérer à une douce chaleur pendant une à deux heures 100 grammes de touraillons. Porter ensuite à l'ébullition. Filtrer. Répartir. Stériliser à 115°.

INFUSION DE FOIN.

Faire macérer pendant une heure ou deux 15 à 20 grammes de foin coupé menu dans 1 000 grammes d'eau. Porter à l'ébullition pendant quelques minutes ; filtrer, répartir, stériliser à 115°.

Cette infusion, légèrement acide, pourrait être neutralisée selon les règles ordinaires.

INFUSION DE PAILLE.

Même préparation que la précédente en remplaçant le foin par une même quantité de paille.

INFUSION DE POMMES DE TERRE.

Une pomme de terre est épluchée, puis râpée; 20 à 30 grammes de la pulpe sont délayés dans un litre d'eau; laisser en contact pendant trois ou quatre heures; décanter, porter le liquide à l'ébullition ; filtrer; répartir en tubes; stériliser.

(1) L'acide phosphorique officinal, de densité de 1,349, renferme 36gr,4 d'acide anhydre p. 100.

L'infusion, souvent acide, peut être neutralisée comme d'ordinaire.

DÉCOCTION DE FRUITS SECS.

Les décoctions de pruneaux et de raisins secs sont utilisées pour la culture des moisissures :

1° Mettre environ 50 à 100 grammes de fruits secs à macérer dans 1 000 grammes d'eau, puis les faire cuire dans cette eau ;

2° Passer au tamis grossier ;

3° Porter le liquide à l'ébullition ; filtrer ;

4° Répartir ; stériliser à 115°.

Le liquide obtenu est légèrement acide ; il convient tel quel pour la culture des moisissures ; dans les autres cas le neutraliser avec la solution de soude avant de le porter à l'ébullition (temps 3).

VIN.

Très employé par Pasteur au début de ses recherches ; n'est guère utilisé aujourd'hui. Avant de le stériliser, le neutraliser ou l'alcaliniser légèrement avec la solution de soude selon les règles ordinaires.

C. — MILIEUX ARTIFICIELS.

Ces milieux ne sont pas employés dans la pratique courante; ils ont été utilisés pour étudier certains points de la biologie des micro-organismes.

Les plus connus sont les suivants :

LIQUIDE DE PASTEUR.

Eau	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Carbonate d'ammoniaque	1 —
Cendres de lessive	1 —

Faire bouillir, filtrer, répartir, stériliser.

La réaction en est alcaline.

LIQUIDE DE COHN.

Eau distillée	100 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	1 —
Phosphate de potasse	0gr,5
Sulfate de magnésie	0gr,5
Phosphate tricalcique	0gr,5

Même préparation. Réaction alcaline.

LIQUIDE DE NÆGELI.

Eau	1000	grammes.
Tartrate d'ammoniaque	10	—
Phosphate de potasse	1	—
Sulfate de magnésie	0gr,2	
Chlorure de calcium	0gr,12c	

Même préparation que précédemment.

LIQUIDE DE RAULIN.

Eau	1500	grammes.
Sucre candi	70	—
Acide tartrique	4	—
Nitrate d'ammoniaque	4	—
Phosphate d'ammoniaque	0gr,6	
Carbonate de potasse	0gr,6	
Carbonate de magnésie	0gr,4	
Sulfate d'ammoniaque	0gr,25	
Sulfate de zinc	0gr,07	
Sulfate de fer	0gr,07	
Silicate de potasse	0gr,07	

Réaction acide. — A servi aux célèbres recherches sur l'Aspergillus niger.

II. — MILIEUX SOLIDES.

Les milieux solides ont été introduits dans la technique par Schrœter et surtout par Koch. Les plus utilisés sont les milieux transparents obtenus en ajoutant au bouillon de viande des substances susceptibles de le solidifier à la température ordinaire; puis viennent les albumines solidifiées par la chaleur (sérum, œuf, etc.), la viande et enfin certaines préparations végétales.

A. — MILIEUX A BASE DE GÉLATINE.

Les milieux à base de gélatine sont très employés, on en prépare plusieurs sortes.

Règles générales. — 1° Se servir de gélatine extra-fine, de marque française, qui se trouve dans le commerce en minces plaques quadrillées pesant environ 2 gr, 50. Si l'on employait la gélatine commune, celle-ci perdant la propriété de se solidifier quand elle a été porté à 102-105c, on serait forcé de stériliser le milieu à 100c, ce qui complique les manipulations.

2° La gélatine est très acide : il faut neutraliser le milieu après l'addition de cette substance, mais avoir soin de s'arrêter à une

réaction neutre ou très faiblement alcaline, la gélatine ne se solidifiant plus quand elle a été chauffée au contact d'un alcali.

3° Les milieux à base de gélatine se liquifiant à + 25°, ne peuvent convenir que pour cultiver les microbes à une température ne dépassant pas 20° à 23°.

GÉLATINE ORDINAIRE.

Procédé recommandé. — C'est ce produit que nous désignerons dorénavant par le mot *gélatine.*

Opérer de même façon que pour la préparation du bouillon.

1°, 2° et 3° Mettre 500 grammes de viande maigre de bœuf dans 1000 grammes d'eau — cuire — exprimer — filtrer chaud.

4° A ce bouillon ajouter :

Peptone Chapoteaut ou Witte	10 grammes.
Sel marin	5 —
Phosphate de soude	Une pincée.
Gélatine extra	80 à 120 grammes.

Suivant la saison il faut varier la quantité de gélatine ; en hiver une gelée à 8 p. 100 suffit (80 grammes), en été il faut atteindre 10 à 12 p. 100 (soit 120 grammes).

Chauffer le tout à feu doux dans une casserole émaillée en agitant constamment pour empêcher la gélatine de prendre au fond ; faire bouillir pendant environ deux minutes.

5° Le liquide obtenu est très acide ; y ajouter de la solution de soude avec prudence, en vérifiant à chaque instant la réaction à l'aide du papier de tournesol. — Se contenter de la neutralisation ou d'une très légère alcalinisation.

6° Porter dans une boîte à lait à l'autoclave à 115° pendant cinq minutes ; les phosphates terreux se précipitent.

7° Au sortir de l'autoclave, jeter le liquide chaud sur un filtre Chardin mouillé et disposé sur un *entonnoir à filtration chaude :* la filtration doit avoir lieu à chaud, sans quoi la gélatine se prendrait en masse et ne traverserait par le filtre.

Entonnoir à filtration chaude. — C'est un entonnoir en cuivre monté sur pieds (fig. 22) et dans lequel on place un second entonnoir de verre dont la douille s'engage dans celle de l'entonnoir métallique qu'elle obture complètement au moyen d'un bouchon ; par un petit tube latéral on verse de l'eau dans l'espace compris entre les deux parois ; on chauffe l'appareil en plaçant un bec de Bunsen sous un appendice que porte la partie inférieure de l'entonnoir métallique. Ne pas atteindre la température d'ébullition, sans quoi il se produirait des projections par le tube de remplissage. Chauffer l'entonnoir avant que d'y verser la gélatine.

Il existe plusieurs modèles de ces appareils, une modification heureuse consiste à utiliser un entonnoir à double paroi métallique et dans lequel on pose simplement l'entonnoir de verre.

On peut encore, plus simplement, placer le filtre sur un entonnoir de verre disposé sur un matras à fond plat; le tout est placé dans l'autoclave dont on porte l'eau à l'ébullition, la filtration se fait très bien dans ces conditions.



Fig. 22. — Entonnoir à filtration chaude.

8° Au sortir du filtre le liquide est recueilli dans un vase à saturation et immédiatement réparti — avant qu'il soit solidifié — dans des tubes à essais (10 à 15 centimètres cubes par tube).

Faire toujours cette répartition à l'aide d'un petit entonnoir de verre, pour ne pas déposer de gélatine sur l'orifice des tubes, ainsi que nous l'avons expliqué page 29.

Le milieu doit être parfaitement clair.

9° Boucher les tubes à l'ouate; stériliser à 112-115° pendant vingt minutes sans dépasser la limite extrême de 115°.

GÉLATINE AU LIEBIG.

1° Dissoudre 5 grammes de Liebig dans 1000 grammes d'eau ajouter falcutativement 10 grammes de peptone et 5 grammes de sel marin), puis faire fondre dans le liquide 100 grammes de gélatine; faire bouillir pendant deux à trois minutes.

2° Neutraliser.

3° Chauffer à 115°. Filtrer. } Comme il a été dit plus haut.
4° Répartir; stériliser. }

RAISIN-GÉLATINE.

1° Faire, en observant les règles exposées page 36, une décoction de 250 grammes de raisins secs dans 1 000 grammes d'eau.

2° Après filtration, ajouter 100 grammes de gélatine et une pincée de phosphate de soude, faire bouillir deux à trois minutes.

3° Neutraliser.

4° Chauffer à 115c; filtrer à chaud.
5° Répartir, stériliser.

GÉLATINE DE BUCHNER.

1° Dissoudre à chaud dans 1000 grammes d'eau :

Gélatine extra	100 grammes.
Sucre de canne	20 —
Extrait de Liebig	5 —
Peptone sèche	5 —

2° Ajouter à la dissolution :

Phosphate tricalcique	5 grammes.

3° Faire bouillir quelques minutes; porter à 115c, filtrer et terminer comme d'ordinaire.

GELÉE DE POMMES DE TERRE (D'APRÈS ELSNER).

1° Prendre 500 grammes de pommes de terre, les peler, les râper.
2° Faire macérer la pulpe obtenue dans un litre d'eau pendant trois à quatre heures.
3° Tamiser; laisser reposer une nuit. Décanter.
4° Ramener le volume à 1 000 centimètres cubes; y dissoudre à feu doux 15 à 20 p. 100 (150 à 200 grammes) de gélatine. Faire bouillir quelques minutes.
5° Au liquide très acide ajouter de la solution de soude jusqu'à réaction faiblement, mais encore *nettement acide*.
6° Chauffer à 115c, cinq minutes. Filtrer à chaud.
7° Répartir, stériliser à 112c-115c.

B. — MILIEUX A BASE DE GÉLOSE.

La *gélose* ou *agar-agar* est une algue de l'océan Indien et se trouve dans le commerce sous forme de lames fibrillaires sèches.

Cette substance a la propriété de former avec l'eau, par la cuisson, des gelées résistantes pouvant supporter, sans se liquéfier, les températures inférieures à + 60c.

La gélose sera donc substituée à la gélatine toutes les fois qu'on désirera obtenir un milieu solide pouvant supporter des températures supérieures à + 25c.

La préparation des milieux gélosés se trouve rendue laborieuse par ce fait que l'agar-agar forme avec l'eau une gelée épaisse, se prenant facilement en masse, très difficile à filtrer.

On tourne cette difficulté en modifiant les propriétés de la gélose par une cuisson prolongée ou par des procédés chimiques (action des acides).

De plus les gelées d'agar-agar seraient toujours troubles si on n'avait soin de les clarifier au moyen de l'albumine, elles restent néanmoins légèrement opalescentes.

GÉLOSE ORDINAIRE.

Procédé recommandé. — C'est le produit obtenu par ce procédé que nous aurons en vue chaque fois qu'au cours de cet ouvrage nous parlerons de *gélose*.

1° Préparer comme il a été dit page 27 un bouillon de viande peptonisé, s'arrêter au temps 5 inclus.

2° Ajouter alors à ce bouillon 15 à 20 grammes d'agar-agar (1,5 à 2 p. 100).

Cet agar doit avoir préalablement trempé dans l'eau froide pendant une heure ou deux, puis avoir été exprimé dans un linge.

3° Le mélange est porté à 100° dans une casserole émaillée et est maintenu à cette température, en ayant soin de remuer constamment pendant le temps nécessaire à la dissolution de l'agar (environ trente minutes).

4° Vérifier la réaction du liquide, réaction qui doit toujours être neutre ou faiblement alcaline (la gélose se transforme en sucre quand elle est chauffée en milieu acide).

5° Laisser refroidir à 55° à 60° et ajouter un blanc d'œuf délayé et battu dans 100 grammes d'eau. Bien mélanger le tout.

6° Porter le mélange à l'autoclave à 120° pendant au moins une heure.

L'albumine coagulée forme un magma qui entraîne les impuretés.

7° Au sortir de l'autoclave jeter le liquide sur un filtre en papier Chardin mouillé et placé dans l'entonnoir à filtration chaude; couvrir l'entonnoir avec une plaque de verre.



Fig. 23. — Tube de gélose inclinée.

8° A mesure que le liquide filtré s'écoule de l'entonnoir le recueillir dans un vase à saturation préalablement chauffé et le répartir aussitôt dans des tubes. Opérer très rapidement pour éviter la solidification; se servir d'un entonnoir pour faire la répartition afin de ne pas mouiller l'orifice des tubes. Verser 8 à 10 centimètres cubes par tube.

9° Stériliser à 115° pendant vingt minutes. Pendant que les tubes sont encore chauds, les disposer sur un plan incliné afin que la gélose se solidifie en surface oblique; laisser les tubes environ trente-six heures dans cette position.

Pour que la mince couche de gélose ne se détache pas de la paroi du tube, quand on place celui-ci verticalement, on a recommandé d'ajouter au milieu une petite quantité de gomme arabique dissoute dans l'eau; nous déconseillons cette pratique qui communique toujours au milieu un trouble assez prononcé et qui est inutile; si on exécute de point en point le procédé que nous indiquons on obtient une gélose suffisamment adhérente.

Modification. — Bien que le procédé ci-dessus donne d'excellents résultats on rend la filtration encore plus facile en usant de l'artifice suivant :

L'agar avant d'être ajouté au bouillon (temps 2) est mis à tremper pendant vingt-quatre heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 6 p. 100 (eau, 500; HCl, 30). Au bout de ce temps on lave l'agar à grande eau, puis on le couvre avec une solution d'ammoniaque liquide à 5 p. 100 (eau, 500; ammoniaque, 25). Après quelques heures de contact laver l'agar à grande eau, exprimer dans un linge et continuer la préparation comme nous l'avons dit.

La gelée aussi obtenue est peu adhérente, aussi déconseillons-nous l'emploi de cette modification.

GÉLOSE DE MALM.

Au bouillon de Liebig ou de Cibils (Voy. p. 30) on ajoute 2 p. 100 de gélose. Opérer comme pour la gélose ordinaire.

PEPTONE-AGAR.

1° Faire un bouillon avec :

Eau	1000	grammes.
Extrait de Liebig	5	—
Peptone	30	—
Sucre de canne	20	—

Alcaliniser légèrement, si besoin est.

2° Dissoudre dans le bouillon 15 grammes d'agar, comme il a été dit plus haut.

3° Terminer l'opération comme pour la gélose ordinaire.

GÉLOSE GLYCÉRINÉE.

Préparer un bouillon glycériné (p. 31) y ajouter 1,5 à 2 p. 100 d'agar et opérer comme d'ordinaire.

GÉLOSE GLUCOSÉE-GLYCÉRINÉE.

Préparer un bouillon glucosé (p. 31); après la filtration ajouter 5 p. 100 de glycérine neutre et 1,5 à 2 p. 100 d'agar. Opérer comme d'ordinaire.

AGAR-GÉLATINE.

On arrive à préparer un milieu dont le point de fusion est compris entre ceux de la gélatine et de la gélose en mélangeant ces deux substances; en été ce milieu peut être substitué avec avantage à la gélatine; le préparer de la manière suivante :

1° A 1 000 grammes de bouillon ajouter :

Gélatine	80	grammes.
Gélose	5	—

ou

Gélatine	50	grammes.
Gélose	8	—

Avoir soin de faire dissoudre d'abord la gélatine dans le bouillon, de neutraliser et d'ajouter seulement alors la gélose.

2° Terminer l'opération comme pour la gélose ordinaire, mais en se contentant de chauffer à 115°.

MOUSSE D'ISLANDE.

Certains auteurs ont remplacé l'agar par la mousse d'Islande (Lichen crispus) ; cette substitution n'est pas à recommander.

C. — SÉRUM.

Le sérum est le liquide qui se sépare par la coagulation du sang; en technique bactériologique on utilise surtout le sérum du bœuf et celui du cheval.

Le sérum est employé, rarement à l'état liquide, plus souvent coagulé par la chaleur.

La qualité capitale des milieux de culture au sérum est qu'ils doivent conserver une transparence presque complète, aussi ne peut-on les porter à une température élevée qui déterminerait leur coagulation en masse et les rendrait opaques : le sérum liquide ne doit pas être exposé à plus de 56-58° ; le sérum solidifié doit être coagulé aux environs de 70° pour conserver sa transparence.

Le sérum ne pourra donc être stérilisé par les procédés ordinaires, il faudra :

A. — Le stériliser par la pasteurisation combinée à la tyndallisation (procédé de Koch).

B. — Utiliser la propriété qu'a le sang d'être stérile dans l'organisme sain, recueillir ce sang aseptiquement et préparer le sérum en le plaçant à l'abri de toute contamination. (Procédé de Roux et Nocard.)

A. **Procédé de Koch.** — *Instrumentation.* — Préparer d'avance :

1° 3 à 4 cristallisoirs à cloche, composés de 2 cristallisoirs de

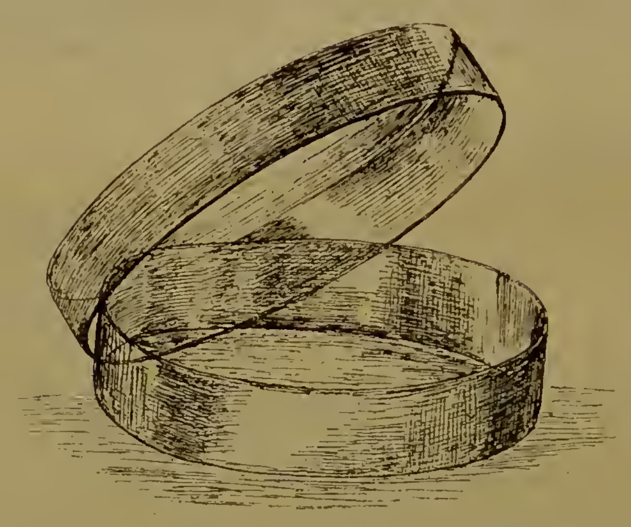
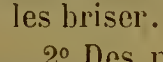


Fig. 24. — Cristallisoir à cloche.

2 litres environ de capacité s'emboîtant l'un dans l'autre (fig. 24).

Ces cristallisoirs enveloppés de papier sont stérilisés à 180° dans le four Pasteur en ayant soin de chauffer très lentement pour ne pas  les briser.

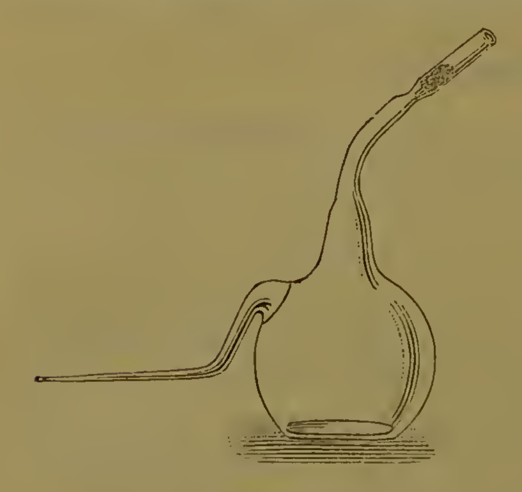


Fig. 25. — Matras répartiteur.

2° Des matras répartiteurs de Chamberland ; les laver, les sécher avec soin, fermer à la lampe l'extrémité effilée, munir le tube B d'un tampon de ouate placé au-dessus de l'étranglement (fig. 25) ; stériliser à 180°.

3° Des ballons à long col de contenance de 500 grammes; les boucher à l'ouate et les stériliser à 180°.

4° Des tubes à essais bouchés à l'ouate et flambés.

Opération. — 1° L'opérateur se transporte à l'abattoir (de préférence par un temps frais), muni des cristallisoirs stérilisés. Les

cristallisoirs sont débarrassés du papier qui les entoure et au moment même où l'on opère la saignée d'un bœuf, l'opérateur soulève le couvercle d'un cristallisoir, expose le récipient au jet de sang et l'emplit aux trois quarts.

Le cristallisoir est recouvert de suite. Recueillir ainsi du sang dans plusieurs cristallisoirs.

2° Les cristallisoirs sont déposés dans un endroit frais, où on les laisse au repos pendant environ trente-six heures. Ne pas placer les cristallisoirs dans de la glace, ce qui provoquerait la dissolution de l'hémoglobine et communiquerait une teinte rougeâtre au sérum.

3° Au bout de trente-six heures le caillot s'est formé ; le sérum clair s'est séparé ; briser la pointe effilée d'un matras de Chamberland, passer cette extrémité effilée dans la flamme d'une lampe à alcool et, en opérant aussi purement que possible, aspirer le sérum dans le matras ; fermer à la lampe la pointe du matras.

4° Le caillot a retenu une certaine quantité de sérum, dissocier ce caillot avec un agitateur de verre flambé ; après quelques heures de repos recueillir à part la nouvelle quantité de sérum qui s'est séparée. Ce sérum moins clair que le précédent pourra néanmoins trouver son utilisation.

5° Les matras de Chamberland pleins de sérum sont rapportés au laboratoire. Le sérum, quelques précautions qu'on ait prises, a été plus ou moins souillé au cours des opérations, il reste à le stériliser. On commence par le répartir dans les ballons à long col : pour cela on flambe dans un bec de Bunsen l'orifice muni d'ouate du ballon, on soulève le tampon d'ouate ; la tubulure effilée du matras de Chamberland préalablement passée dans la flamme et dont la pointe a été cassée avec une pince flambée, est introduite profondément dans le col du ballon et en soufflant par le tube B on fait écouler le sérum dans la panse du ballon. Pendant tout ce temps le bouchon d'ouate du ballon est tenu entre le pouce et l'index de la main gauche.

6° Le ballon étant aux trois quarts plein, on replace son bouchon d'ouate et on en porte le col dans la flamme d'un chalumeau à gaz ; on ferme le col à quelques centimètres de la panse. On emplit autant de ballons qu'il en faut pour contenir le sérum recueilli.

7° Les ballons ainsi préparés sont portés dans le bain-marie décrit page 13 et chauffés, comme il a été dit, 1 heure à 58° pendant huit jours consécutifs.

8° Le sérum est alors stérilisé ; reste à le répartir en tubes.

Avec un couteau à verre on raye le col du ballon un peu au-dessous de l'extrémité fermée à la lampe, puis on appuie sur l'encoche ainsi produite la pointe effilée d'un tube de verre fondue et portée au rouge

blanc : une fêlure se produit; on fait progresser la fêlure en touchant son extrémité avec la pointe de verre chauffée à blanc ; les deux extrémités du trait de fracture se rejoignent bientôt et l'on peut facilement séparer par un léger choc un capuchon de verre comprenant toute la partie du col scellée à la lampe : le ballon est ouvert.

On place le ballon sur un valet de paille de telle sorte que son col ait une position presque horizontale.

Flamber dans un bec Bunsen la tubulure effilée d'un matras

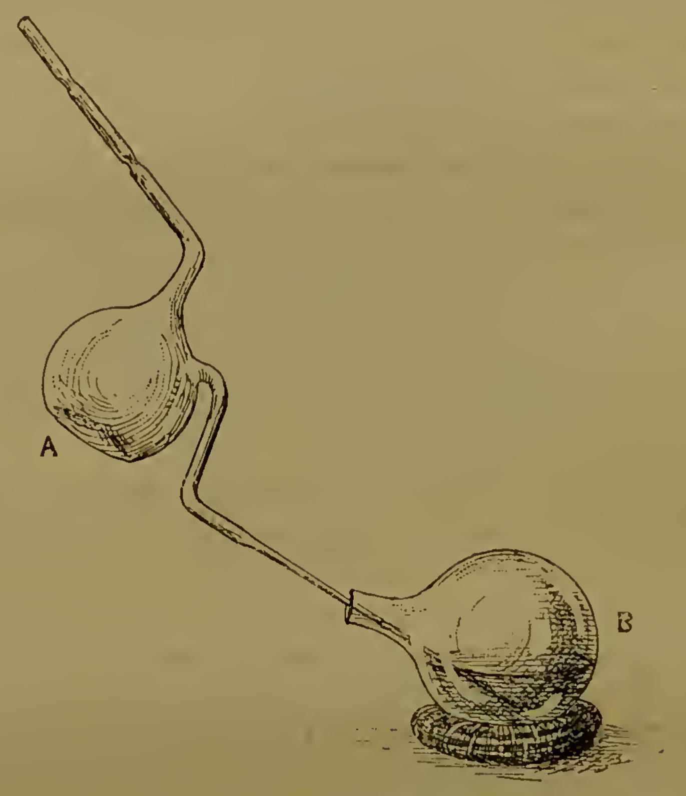


Fig. 26. — Répartition du sérum.

Chamberland stérile, en casser la pointe avec une pince flambée, introduire l'effilure dans le ballon en touchant presque le fond et aspirer le sérum dans le matras. Arrêter l'aspiration de façon à laisser dans le ballon la couche superficielle du liquide, couche qui s'est trouvée au contact de l'air et a pu être souillée par les poussières atmosphériques (fig. 26).

9° A l'aide du matras répartir le sérum dans des tubes flambés : passer rapidement dans la flamme la tubulure effilée du ballon, flamber l'orifice du tube avant d'en enlever le bouchon d'ouate (se conformer aux règles énoncées p. 61). Verser avec la pipette environ 10 centimètres cubes de sérum par tube; replacer le bouchon d'ouate.

Le sérum est alors prêt, soit pour servir à l'état liquide (après observation de quarante-huit heures à l'étuve à 30°), soit pour être gélatinisé.

Dans ce dernier cas, la gélatinisation doit être opérée le plus rapidement possible : si quelques germes avaient pénétré dans les tubes

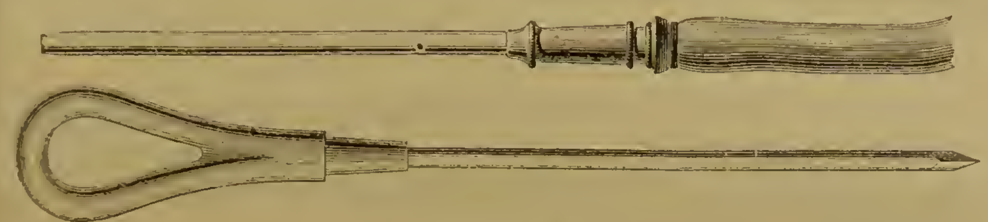


Fig. 27. — Trocart de Nocard.

pendant la répartition ils risqueraient fort d'être détruits par la chauffe de gélatinisation.

B. **Procédé de Roux et Nocard.** — Ce procédé a sur le précédent l'avantage de fournir un sérum beaucoup plus clair et plus favorable aux cultures; il devra être mis en usage chaque fois que les circonstances le permettront.

Instrumentation. — Préparer :

1° Un trocart de Nocard (fig. 27), sur la canule duquel, le mandrin étant enlevé, peut s'adapter un ajutage métallique qui porte un tube de caoutchouc rouge long de 50 centimètres environ et terminé à son extrémité inférieure par un tube de verre de 15 centimètres de long.

Le trocart et le tube de caoutchouc muni de ses ajutages sont enveloppés séparément dans du papier filtre et stérilisés à l'autoclave, ou plus simplement plongés pendant dix minutes dans de l'eau bouillante au moment de l'opération.

2° Un ciseau courbe sur le plat et un bistouri également asepsiés par ébullition.

3° Un ou deux flacons à large ouverture de 3 litres environ de capacité.

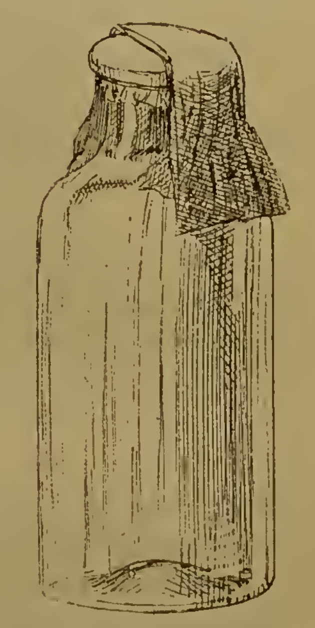


Fig. 28. — Bocal pour recueillir le sang.

La partie droite du premier capuchon a été supprimée pour montrer le second capuchon.

Ces flacons, bien lavés, sont soigneusement séchés, puis on coiffe leur orifice avec deux ou trois doubles de papier qu'on assujettit sur le col à l'aide d'une ficelle; par-dessus ce premier bouchage on en fait un second identique mais fixé avec une ficelle plus bas que le précédent, de telle sorte qu'on puisse enlever ce capuchon extérieur sans toucher à celui placé au-dessous.

Les flacons ainsi préparés sont stérilisés au four Pasteur.

4° Des matras de Chamberland et des tubes à essais stériles.

Opération. — On peut recueillir le sérum sur un cheval ou sur un âne; dans ce cas l'animal est laissé debout, on peut au besoin lui couvrir les yeux et le maintenir au moyen d'un serre-nez. Si l'on utilise un bovidé, il sera avantageux de coucher l'animal sur la table à inoculations vaccinales. On devra s'adresser de préférence à un animal à jeun.

1° Opérer comme si l'on voulait pratiquer la saignée de la jugulaire. Faire comprimer et saillir la veine du cou ; au-dessus du point comprimé, sur le trajet du vaisseau, faire au bistouri une petite incision longitudinale de la peau;

2° Par l'incision, enfoncer le trocart entre la veine et la peau sur une longueur de 2 centimètres environ, puis piquer la veine et y faire pénétrer le trocart parallèlement à l'axe du vaisseau.

3° La canule restant en place, retirer le trocart et y substituer l'ajutage métallique portant le tube de caoutchouc; pendant ce temps l'aide comprime la veine un peu au-dessus de la canule et empêche le sang de s'écouler. Faire vite.

4° Le tube de caoutchouc mis en place est comprimé entre le pouce et l'index de la main gauche de l'opérateur, l'aide cesse la pression au-dessus de la canule, mais continue toujours de comprimer au-dessous.

5° Un second aide approche le flacon stérilisé, détache et soulève le capuchon extérieur, enfonce le tube de verre terminant le caoutchouc à travers le deuxième capuchon; les doigts de l'opérateur cessent de comprimer le tube et le sang s'écoule dans le flacon.

Le premier flacon étant aux trois quarts plein, l'opérateur comprime à nouveau le tube de caoutchouc, l'aide retire du col du flacon l'ajutage de verre, recouvre rapidement le flacon avec le capuchon de papier et assujettit celui-ci autour du col. On opère de même pour emplir le deuxième flacon.

Un cheval peut ainsi fournir, sans que sa santé ultérieure en souffre, de 5 à 6 litres de sang; sur de jeunes génisses nous n'avons jamais retiré plus de 3 litres.

6° Les bocaux sont portés dans un endroit frais ; au bout de trente-six ou quarante-huit heures le sérum surnage; il a une belle couleur citrine et est transparent.

On aspire purement le sérum avec un matras de Chamberland et on le répartit immédiatement dans des tubes stérilisés.

Gélatinisation du sérum. — Le sérum a la propriété de se coaguler par la chaleur; pour lui conserver sa transparence il faut opérer cette coagulation ou gélatinisation entre 68° et 70°; pour que la

solidification soit complète, il faut maintenir cette température pendant un temps variant de deux à cinq heures.

On donne au sérum, dans les tubes, une disposition en plan incliné semblable à celle qui est adoptée pour la gélose.

Pour opérer la gélatinisation on utilise d'ordinaire l'*appareil de Koch modifié* (fig. 29).

Cet appareil se compose d'une boîte rectangulaire en cuivre, à double paroi et montée sur des pieds permettant de lui donner une inclinaison plus ou moins accentuée sur l'horizontale. La double

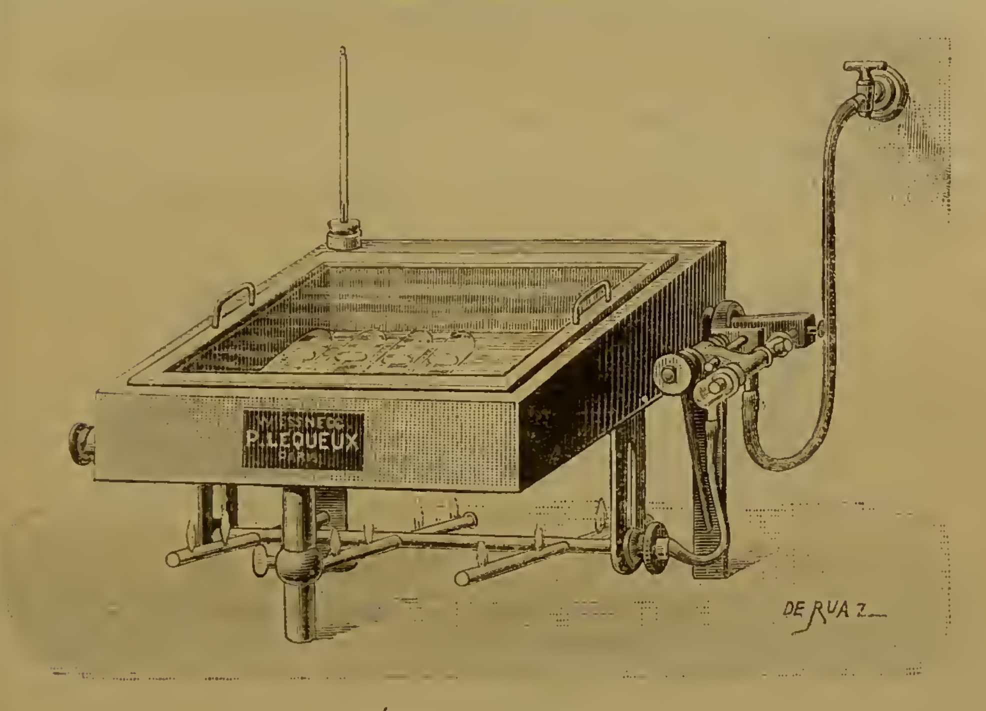


Fig. 29. — Étuve pour coaguler le sérum.

paroi est remplie d'eau; l'espace interne reçoit une couche mince de sable sur laquelle sont couchés les tubes de sérum ; un thermomètre est placé à côté des tubes. A sa partie supérieure la boîte est fermée par un couvercle mobile composé de deux lames de verre fixées dans un cadre métallique et séparées par une mince couche d'air. Une rampe à gaz est située sous l'appareil; le gaz, pour s'y rendre, traverse un régulateur de Roux immergé dans l'eau de la double paroi; on conduit l'opération ainsi qu'il suit :

1° Les tubes sont couchés sur le sable; on a soin que l'inclinaison de l'appareil soit telle que le sérum ne touche pas les bouchons d'ouate des tubes.

2° Allumer le gaz; quand le thermomètre intérieur atteint 68°, régler l'appareil (Voy. p. 75) de façon à maintenir la température à ce degré.

3° La durée de la chauffe nécessaire pour obtenir la solidification complète varie (de une à trois heures) avec les différents échantillons ; il faut surveiller la marche de l'opération en retirant de temps en temps un tube pour examiner le degré de coagulation. La gélatinisation est achevée quand on peut redresser le tube sans que le sérum perde sa position en plan incliné. Cesser alors de chauffer. Le sérum gélatinisé doit avoir conservé une teinte jaune ambré et être transparent.

4° Les tubes sont mis en observation pendant environ trente-six heures à l'étuve à 30°, pour que l'on s'assure qu'ils ne sont pas contaminés, puis ils peuvent être mis en service

Quand on ne veut gélatiniser qu'un petit nombre de tubes de sérum on peut se passer de l'appareil de Koch. On dispose alors les tubes dans une petite boîte plate en cuivre d'environ 12 centimètres de largeur et dont une des parois porte des encoches destinées à recevoir l'extrémité supérieure

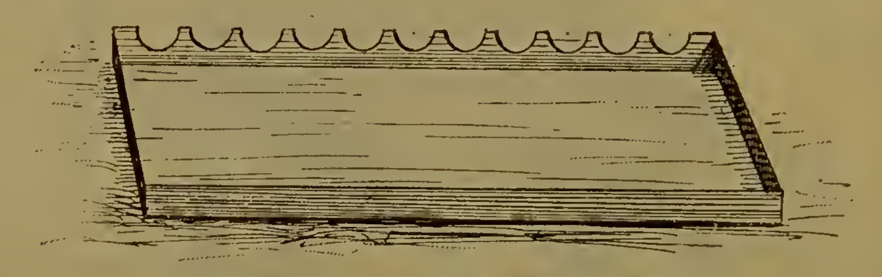


Fig. 30. — Plateau pour coaguler le sérum.

des tubes : ceux-ci, dont le fond repose sur la paroi inférieure de la boîte, sont ainsi maintenus en position inclinée; on couvre avec une lame de verre et dispose le tout sur une casserole pleine d'eau que l'on porte à l'ébullition ; il faut une heure ou deux pour opérer la gélatinisation.

SÉROSITÉ DES ÉPANCHEMENTS.

Les épanchements pleurétiques stériles (pleurésie franche) fournissent souvent un sérum très clair bien coagulable et que l'on peut utiliser comme milieu de culture.

Pour recueillir purement cette sérosité, opérer comme pour les ponctions ordinaires, mais en ayant soin d'employer un appareil de Potain préalablement stérilisé : le trocart est bouilli ; le bouchon en caoutchouc et le tube d'aspiration sont portés à 115° à l'autoclave; le flacon est flambé au four Pasteur. On distribue ensuite le sérum dans des tubes stériles avec un matras de Chamberland.

On peut obtenir ainsi du sérum absolument pur ; cependant, dans la plupart des cas, il est nécessaire de tyndalliser le liquide avant de le coaguler (opérer comme pour le sérum du sang).

Les épanchements ascitiques ne fournissent d'ordinaire qu'un sérum mal coagulable et par conséquent inutilisable.

SÉRUM GLYCÉRINÉ.

En mêlant 6 à 8 p. 100 de glycérine pure au sérum on obtient un milieu excellent pour la culture du bacille de la tuberculose.

1° Aspirer dans un matras de Chamberland flambé 6 à 8 grammes de glycérine pure préalablement stérilisée à l'autoclave.

2° Aspirer ensuite dans le matras 100 centimètres cubes de sérum liquide stérile (pour faciliter cette opération on peut jauger préalablement le matras).

3° Répartir en tubes; gélatiniser à 75°, ce sérum ne se coagulant qu'à une température plus élevée que le sérum ordinaire.

SÉRUM DE LÖFFLER.

1° Préparer suivant le mode ordinaire un bouillon avec :

Eau	1000 grammes.
Viande de bœuf	500 —
Peptone	20 —
Sel marin	5 —
Glycose	10 —
Solution de soude	Q. S. pour légère alcalinité.

2° Aspirer dans un matras de Chamberland une partie de ce bouillon et 3 parties de sérum liquide pur.

3° Répartir le mélange en tubes; gélatiniser à 70°-75°.

D. — ŒUFS.

Les œufs peuvent être utilisés sous plusieurs formes :

A. — Prendre un œuf frais, le secouer violemment pour mélanger le blanc et le jaune ; laver la coquille au sublimé, puis l'essuyer avec un papier filtre stérilisé ; flamber le bout mince de l'œuf jusqu'à ce que la coquille noircisse, à ce niveau faire un trou avec une pointe métallique flambée ; par le trou introduire le fil de platine ou la pipette (Voy. p. 61) chargée du produit à ensemencer ; fermer le trou avec un peu de cire Golaz en fusion.

B. — Prendre un œuf frais, en flamber la pointe, y faire un trou comme il a été dit plus haut ; aspirer le blanc dans une pipette stérilisée ; répartir le liquide albumineux dans des tubes flambés. Coaguler à 70° comme le sérum.

C. — Faire cuire dur un œuf, puis l'éplucher et le couper en mor-

ceaux que l'on place dans de petits cristallisoirs à cloche ou dans des boîtes de Petri, et stériliser les cristallisoirs ou boîtes à 115°.

E. — VIANDE.

Dans un flacon ou un matras de contenance de 1 litre mettre 500 à 600 grammes de viande de bœuf maigre finement hachée ; ajouter quelques centimètres cubes de solution de soude pour neutraliser ou alcaliniser faiblement. Boucher à l'ouate. Stériliser à 115°.

F. — POMMES DE TERRE.

A. — 1° Choisir des pommes de terre très saines, les brosser avec soin sous un courant d'eau pour les débarrasser de toute trace de terre, les essuyer, les éplucher.

2° Couper des tranches perpendiculaires à l'axe du tubercule et épaisses de 10 à 15 millimètres, les jeter dans un grand cristallisoir plein d'eau distillée.

Éviter dans ces manipulations de toucher la surface des tranches avec les doigts : se servir pour couper les tranches, d'un couteau à lame d'argent, le couteau d'acier noircissant souvent les surfaces de section.

3° Sécher les tranches entre deux doubles de papier à filtrer blanc.

4° Placer les tranches dans les boîtes de Petri ou mieux des petits cristallisoirs à couvercle.

5° Stériliser le tout à 120° pendant vingt minutes.

Il faut stériliser à 120°, car la surface du tubercule contient un microbe très résistant (Bac. de la pomme de terre) et le couteau entraîne toujours quelques-uns de ces germes sur les surfaces de section.

B. — **Procédé recommandé.** — 1° Laver et brosser des pommes de terre comme dans le procédé précédent ;

2° Les pommes de terre sont coupées, non plus en tranches, mais en morceaux affectant la forme de parallélipipèdes allongés ou de demi-cylindres longs de 4 à 5 centimètres de manière à pouvoir être placés dans des tubes spéciaux dit tubes à pomme de terre ou tubes de Roux.

Ces tubes sont de diamètre un peu supérieur à celui des tubes employés couramment pour les cultures ; ils portent vers leur quart inférieur un étranglement sur lequel repose la pomme de terre ; dans l'ampoule inférieure se réunit l'eau de condensation.

Il est commode pour découper les pommes de terre de se servir d'un

emporte-pièce spécial qui donne des morceaux plus élégants et plus réguliers.

Ne pas faire les morceaux trop longs, sans quoi ils s'incurvent en cuisant.

3° Laver les morceaux à l'eau distillée ; les essuyer sur un papier filtre.

4° Les placer dans les tubes ; boucher à l'ouate.

5° Stériliser comme plus haut.





Fig. 31. — Morceaux de pomme de terre pour culture en tube.

Fig. 32. — Tube pour culture sur pomme de terre.

Remarque. — Les pommes de terre sont ordinairement de réaction neutre, on en rencontre parfois de fortement acides, sur lesquelles les bactéries ne peuvent se développer. Si l'on se trouvait dans l'obligation d'utiliser ces pommes de terre acides on en ferait tremper les morceaux, pendant quelques heures avant la stérilisation, dans une solution de soude à 5 p. 1000.

C. — **Purée de pommes de terre.** — 1° Éplucher des pommes de terre, les couper en quartiers, les faire cuire à l'eau.

2° Les passer au presse-purée.

3° Répartir la purée en couches d'environ 1 à 2 centimètres dans les boites de Petri ou des cristallisoirs à couvercle.

4° Stériliser vingt minutes à 120°

G. — GELÉE D'AMIDON.

Délayer 10 grammes de fécule de pomme de terre dans 180 grammes d'eau ; ajouter 5 grammes de carbonate de chaux précipité ; répartir dans des flacons d'Erlenmeyer ou dans des boîtes de Petri ; stériliser à 115° ; lorsque l'empois est refroidi, il forme sur le fond des vases une couche blanchâtre homogène.

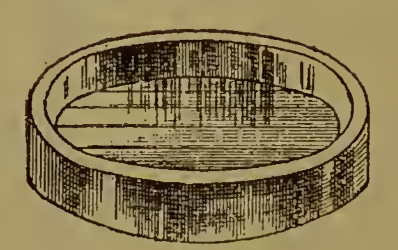
H. — PAIN.

A. — Des tranches de pain blanc imbibées d'eau distillée sont placées dans des cristallisoirs à couvercle et stérilisées à 115° pendant vingt minutes.

B. — 1° Prendre de la mie de pain blanc, l'émietter finement, la faire sécher à l'air entre deux feuilles de papier filtre.

2° La poudre étant bien sèche, la moudre finement dans un moulin à café.

3° Disposer cette poudre en couches de 1 à 2 centimètres d'épaisseur dans des boîtes de Petri, de Soyka, ou des flacons d'Erlenmeyer,



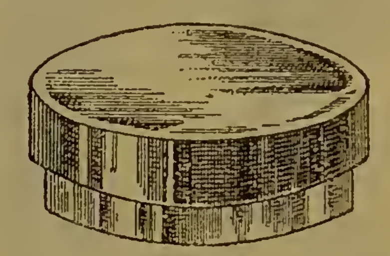


Fig. 33. — Boîtes de Petri.

ajouter de l'eau distillée en quantité suffisante pour imbiber toute la couche (en poids, environ 2 parties et demie pour 1 partie de pain).

4° Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

I. — LAIT DE RIZ.

1° Mélanger intimement :

Lait	150	grammes.
Bouillon	50	—
Riz en poudre	100	—

2° Répartir le mélange dans des boîtes de Soyka en couche de 1 à 2 centimètres d'épaisseur.

3° Porter à 115° pendant vingt minutes, le mélange se solidifie et forme une couche blanc opaque.

J. — MILIEUX COLORÉS.

On emploie les milieux colorés pour le diagnostic de certains microbes qui y produisent, en se développant, des changements de coloration.

On n'utilise guère aujourd'hui que les milieux colorés à l'aide du

tournesol bleu et additionnés d'une matière sucrée : les microbes qui fabriquent des acides aux dépens de cette substance font virer le tournesol au rouge.

Préparation de la teinture de tournesol. — On pulvérise le tournesol en pains, on le fait bouillir avec de l'alcool à 85° qu'on jette ensuite; on arrose le résidu avec 6 à 8 parties d'eau, on chauffe, on filtre et on conserve le liquide dans un flacon fermé par un tampon de coton. A la moitié de cette teinture on ajoute de l'acide sulfurique étendu jusqu'à ce que la coloration soit presque rouge, et on réunit à l'autre moitié pour avoir la teinture sensible. Cette teinture sensible est répartie dans des tubes bouchés à l'ouate et stérilisée à 115°.

GÉLATINE LACTOSÉE AU TOURNESOL.

1° Préparer de la gélatine lactosée de la même façon que la gélatine ordinaire mais en ajoutant (temps 4) 2 à 4 p. 100 de lactose; la répartir en tubes; stériliser.

2° Préparer des tubes de tournesol stérilisés.

3° Au moment du besoin, liquéfier la gélatine au bain-marie et y ajouter avec une pipette stérile une quantité de teinture de tournesol suffisante pour obtenir une teinte bleue franche.

Ne jamais stériliser les milieux préalablement colorés; la teinte bleue disparaîtrait par le chauffage.

Préparer de même la gélatine glucosée, mannitée, etc., et aussi les géloses au tournesol.

LAIT AU TOURNESOL.

Additionner du lait stérile d'une quantité suffisante de teinture préalablement stérilisée.

MILIEU DE NŒGGERATH.

Mélanger dans les proportions suivantes des solutions aqueuses saturées des couleurs d'aniline ci-dessous indiquées :

Bleu de méthyle	2	centimètres cubes.
Violet de gentiane	4	—
Vert de méthyle	1	—
Chrysoïdine	4	—
Fuchsine	3	—

Ajouter 200 centimètres cubes d'eau distillée.

La solution a une teinte neutre, gris bleu; la laisser reposer

quinze jours, puis si sa coloration s'est modifiée, la ramener à la teinte primitive en y ajoutant, suivant le cas, du bleu, du vert, du rouge, etc. Stériliser à 100°.

Au moment du besoin on ajoute 7 à 10 gouttes du mélange stérilisé dans un tube de gélatine ou de gélose ordinaires liquéfiées au bain-marie.

Gasser a substitué à ce mélange l'usage d'une solution aqueuse saturée de fuchsine, que l'on stérilise à l'autoclave et dont on ajoute XX gouttes à un tube de gélose liquéfiée.

L'usage de ces milieux, recommandés par leurs auteurs pour la diagnose du bacille d'Eberth, est tombé en désuétude.

CHAPITRE III

ENSEMENCEMENT ET DISPOSITION DES CULTURES AÉROBIES

Nous devons maintenant apprendre à ensemencer les milieux de culture et à assurer le développement des germes dans ces milieux.

Comme nous l'avons dit, les cultures des microbes aérobies doivent être contenues dans des vases permettant l'accès de l'air, mais les défendant contre les poussières atmosphériques.

Les bouchons d'ouate, les capuchons de papier, les cloches en verre sont les moyens de protection les plus ordinairement employés.

Les vases de culture peuvent être très variés : tubes à essais, matras Pasteur, fioles diverses, cristallisoirs de Petri, boîtes de Soyka, etc.

Quand on pratique un ensemencement, plusieurs règles sont à observer :

1° Utiliser pour prélever la semence un instrument stérile.

2° Prélever purement la semence.

3° Reporter purement la semence dans le milieu à ensemencer.

A. Les instruments utilisés pour les prélèvements sont : la *pipette Pasteur*, le *fil de platine*, l'*aiguille de verre*.

I. **Pipette Pasteur**. — La pipette Pasteur se compose d'un tube de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre intérieur, effilé et fermé à la lampe à une de ses extrémités, ouvert et muni d'un tampon d'ouate à l'autre; la pipette doit avoir une longueur totale de 20 à 25 centimètres.

On aura toujours une provision de pipettes préparées d'avance.

Fabrication. — 1° Prendre un tube de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre intérieur; avec le couteau à verre y pratiquer des traits déterminant des fragments de 25 centimètres environ de longueur (le tube de verre que l'on trouve dans le commerce a environ 1 mètre de long et fournit 4 fragments).

2° Séparer les fragments en rompant le tube tenu entre les mains, les pouces étant appuyés de part et d'autre de chaque côté du trait du couteau.

3° Passer les deux extrémités de chaque fragment dans la flamme du chalumeau à gaz pour émousser les arêtes de section.

4° Munir les deux extrémités de chaque tube d'un petit tampon d'ouate enfoncé complètement dans le tube qui doit le déborder de quelques millimètres (fig. 34); pour cela prendre un fragment



Fig. 34. — Préparation des pipettes de Pasteur.

d'ouate et l'enfoncer dans le tube en serrant légèrement à l'aide d'une pointe mousse (l'extrémité effilée d'un tiers-point convient très bien).

5° Porter la partie médiane du tube ainsi préparé dans la flamme d'un chalumeau (flamme moyenne), ramollir le verre en tournant constamment le tube entre les pouces et les index; quand le verre est devenu malléable, sortir rapidement le tube de la flamme et l'étirer de façon à produire une effilure longue d'environ 30 centimètres (fig. 34, A). Couper l'effilure par le milieu dans la pointe de la flamme du chalumeau : on obtient ainsi deux pipettes dont les extrémités effilées se trouvent scellées.

Cette manipulation très simple exige cependant un certain tour de main. Avoir soin d'étirer le tube en position bien rectiligne : pour cela, les coudes de l'opérateur doivent être appuyés sur la table. Toujours étirer hors de la flamme; ne pas produire une effilure trop mince et par conséquent trop fragile.

6° Les pipettes ainsi préparées sont placées dans un panier en toile métallique, leur grosse extrémité reposant sur le fond du panier, et stérilisées à 180° dans le four Pasteur. Elles sont alors prêtes à servir.

Utilisation. — 1° Casser, avec une pince à dissection ou entre l'ongle du pouce et la pulpe de l'index, l'extrémité scellée de la partie effilée de la pipette.

2° Passer dans la flamme d'un bec Bunsen ou d'une lampe à alcool l'effilure de la pipette pour détruire les germes qui ont pu se déposer à la surface.

3° Plonger l'extrémité de cette effilure dans le liquide à ense-

mencer, celui-ci monte dans le tube par capillarité ou par une aspiration pratiquée avec la bouche à l'autre extrémité de la pipette.

Dans cette manœuvre avoir soin que le liquide aspiré n'atteigne pas le bouchon d'ouate de l'orifice supérieur de la pipette.

4° Reporter rapidement la pointe de la pipette au contact du milieu à fertiliser et y laisser tomber — par l'action de la pesanteur ou en soufflant légèrement par l'orifice supérieur — une ou plusieurs gouttes du liquide semence.

5° On peut conserver indéfiniment à l'abri de toute contamination le liquide aspiré dans la pipette; pour cela on porte l'extrémité effilée dans une petite flamme (veilleuse du bec de Bunsen par exemple) en inclinant un peu la pipette pour que le liquide reflue vers la partie large; quand le verre est ramolli par la chaleur on étire, avec une pince à dissection, jusqu'à fermeture complète, l'extrême pointe de l'effilure.

II. **Fil de platine**. — Dans la pratique des ensemencements, le fil de platine doit être préféré à tout autre fil métallique à cause de son inaltérabilité qui permet de le porter au rouge sans en produire l'oxydation.

Le fil de platine, à cause même de sa grande conductibilité, ne peut être tenu avec les doigts, il faut l'emmancher avant de l'utiliser.

Le fil de platine ainsi emmanché, *öse* des Allemands, répond à tous les besoins. On trouve dans le commerce trois types de fil, le gros, le moyen, le fin; chacune de ces sortes de fil trouve son utilisation.

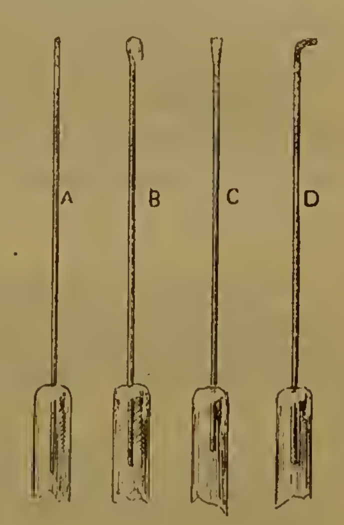


Fig. 35. — Öses de platine.

Le fil de platine fin est le plus commode, car il se refroidit très rapidement, ce qui, nous le verrons plus tard, est une condition importante de réussite dans la pratique des ensemencements; mais il est très peu résistant, très flexible et ne convient pas quand on veut prélever une culture adhérente sur milieu solide ou ensemencer un milieu rugueux, tel que la pomme de terre, par exemple.

En pratique, il faudra toujours avoir à portée de la main :

Un fil de platine fin, rectiligne pour les ensemencements par piqûre.

Un fil de platine fin, terminé en boucle pour prélever une goutte.

Un fil de platine moyen, qu'il est avantageux de courber à angle droit près de son extrémité.

Un fil de platine gros dont l'extrémité est écrasée en forme de spatule.

Ces fils seront montés de la façon suivante :

Préparation de l'öse. — 1° Prendre une baguette de verre de 5 à 7 millimètres de diamètre, la diviser en fragments de 20 à 25 centimètres de longueur (faire un trait au couteau à verre, puis rompre entre les doigts au niveau de ce trait).

2° Couper avec de forts ciseaux des morceaux de fil de platine longs de 5 à 7 centimètres.

3° Saisir de la main gauche un fragment de baguette, en ramollir une extrémité dans la flamme du chalumeau, en faisant constamment tourner la baguette entre les doigts. Pendant ce temps la main droite de l'opérateur tient, à l'aide d'une pince, le morceau de fil de platine à environ 15 millimètres d'une de ses extrémités, elle porte cette extrémité dans la flamme et la chauffe au rouge blanc.

4° Quand l'extrémité de la baguette de verre est bien ramollie, y introduire bien droit l'extrémité chaude du fil de platine et l'y faire pénétrer sur une longueur d'un centimètre et plus. Chauffer le tout quelques instants, puis laisser refroidir.

5° Porter rapidement l'autre extrémité de la baguette de verre dans la flamme pour en émousser l'arête tranchante.

6° Avec une pince à dissection, contourner en boucle, couder à angle droit, ou écraser avec un marteau, suivant le cas, l'extrémité libre du fil de platine.

Utilisation. — 1° Tenir la baguette de verre par son tiers supérieur, en passer très rapidement l'extrémité inférieure (où se trouve le fil de platine) dans la flamme d'un bec de Bunsen, pour détruire les germes déposés à la surface du verre.

Ce flambage doit être très rapide, la surface lisse du verre se stérilisant rapidement et ne devant d'ailleurs pas entrer en contact immédiat avec la culture; en chauffant trop fortement on risquerait de faire éclater le verre au point où est soudé le fil de platine.

2° Porter ensuite au rouge le fil de platine, le sortir de la flamme et le laisser quelques secondes à l'air pour qu'il refroidisse.

L'exposition du fil à l'air doit être limitée au temps strictement nécessaire à son refroidissement, sans quoi ce fil risquerait d'être souillé par les poussières atmosphériques : c'est pourquoi le fil fin, se refroidissant rapidement, est ordinairement employé.

3° Porter rapidement le fil de platine sur le produit à ensemencer, puis le faire pénétrer dans le milieu à fertiliser.

4° L'ensemencement terminé, le fil de platine doit être porté au rouge pour être débarrassé des germes qui y sont restés adhérents.

Cette précaution est particulièrement indispensable quand on manie les cultures des microbes pathogènes; si on omettait de la prendre on souillerait la table et les divers objets au contact desquels pourrait se trouver l'öse.

III. **Aiguilles de verre.** — Étirer une baguette de verre de la même façon que l'on étire le tube dans la préparation des pipettes Pasteur. Au moyen du couteau à verre, couper carrément, par son milieu, la partie effilée. On peut ainsi préparer des aiguilles aussi fines qu'on le désire.

Ces aiguilles, moins maniables que le fil de platine, ont sur celui-ci l'avantage d'être rigides : elles conviennent très bien pour pratiquer les ensemencements en piqûre profonde (gélatine).

Flamber ces aiguilles au moment de les utiliser.

I. — ENSEMENCEMENTS.

Les ensemencements peuvent être pratiqués à l'aide d'une culture préalable ou encore d'eau, de poussières, de sang, d'humeurs, etc., mais toujours leur technique reste la même, seul le mode de *prélèvement* de l'échantillon à ensemencer varie avec les différentes substances. Nous apprendrons plus tard à faire ces divers prélèvements; pour le moment nous allons supposer que nous avons à pratiquer des ensemencements à l'aide d'une culture préalable et nous prendrons comme type une culture en bouillon de la bactéridie charbonneuse.

L'opération se décompose en trois temps :

I. Ouvrir le tube où doit être prélevée la semence.

II. Prélever la semence.

III. La reporter dans le milieu à fertiliser. Ici plusieurs cas peuvent se présenter; on peut ensemencer :

a. En bouillon ou dans tout autre milieu liquide.

b. En strie sur gélose, gélatine, sérum inclinés ou pomme de terre.

c. En piqûre en gélatine.

d. En colonies séparées (*isolement*); ce dernier cas fera l'objet d'un chapitre spécial.

A. — **Ensemencement dans un milieu liquide**. — Nous prendrons le tube de bouillon comme type du milieu liquide.

1° Prendre un tube de bouillon stérilisé et le tube contenant la culture à réensemencer; flamber le bouchon d'ouate qui ferme

l'orifice de chacun de ces tubes pour détruire les poussières qui s'y sont déposées ; saisir successivement les bouchons entre le pouce et l'index de la main droite et les dégager légèrement en les tournant sur eux-mêmes par un mouvement de vrille.

2° Placer les deux tubes côte à côte dans la main gauche, dans une position presque horizontale, le fond des tubes reposant dans le

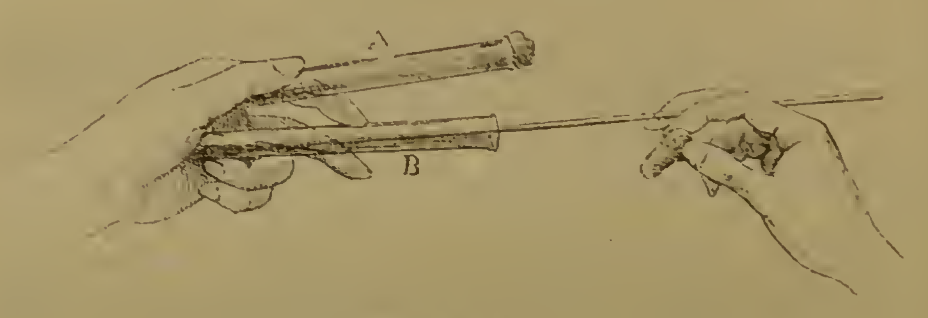


Fig. 36. — Ensemencement en milieu liquide.

creux de la main, leur partie postérieure étant maintenue entre le pouce, l'index et le médius.

3° Prendre entre l'index et le médius de la main droite l'öse (fil à boucle) et la flamber comme il a été dit.

4° Pendant que l'öse refroidit, saisir entre le pouce et la pulpe de l'index de la main droite le bouchon d'ouate du tube semence, enlever ce bouchon déjà dégagé en partie au temps 1. Conserver le bouchon entre le pouce et l'index.

5° Introduire rapidement l'öse dans le tube sans qu'elle touche les bords de l'orifice ; le fil de platine prélève une goutte de la culture et est vivement retiré du tube (fig. 36).

Immédiatement l'orifice du tube est porté dans la flamme pour détruire les germes qui auraient pu s'y déposer pendant le prélèvement et le bouchon d'ouate est remis en place.

6° Enlever de même le bouchon d'ouate du tube à fertiliser ; plonger l'öse chargée de la semence dans le bouillon et la retirer rapidement.

Flamber et reboucher l'orifice, comme précédemment.

7° Avant de déposer l'öse sur la table, la porter au rouge pour détruire les germes qui y adhèrent (bactéridie charbonneuse, dangereuse pour l'homme, dans le cas actuel).

8° S'assurer de la fixité des bouchons d'ouate ; placer sur le tube ensemencé une étiquette indiquant la nature de la culture et la date de l'ensemencement.

Il est souvent plus commode de coiffer l'orifice du tube, par-dessus le bouchon d'ouate, avec un petit capuchon que l'on prépare

extemporanément en enroulant autour de la partie terminale du tube une petite bandelette de papier dont on tortille le bord supérieur; on inscrit sur cette bandelette les indications précédentes (fig. 37). Ce capuchon a en outre l'avantage de protéger le bouchon d'ouate de toute souillure.

Remarques. — Avoir soin de toujours tenir les tubes que l'on doit ouvrir, dans une position oblique, presque horizontale, pour y empêcher la chute des poussières atmosphériques. — Opérer très rapidement pour restreindre les chances de contamination. — Ne jamais poser sur la table les bouchons d'ouate dont la partie qui pénètre dans les tubes doit être préservée de tout contact. — Le manche de verre de l'öse ne doit jamais toucher les milieux de culture.



Fig. 37. — Tube de culture avec capuchon de papier.

B. — **Ensemencements en strie.** — Nous décrirons comme type un ensemencement sur gélose inclinée :

1° Opérer comme il est dit en A en remplaçant le tube de bouillon stérile par un tube de gélose.

2°-3°-4°-5° Comme en A.

6° Le bouchon d'ouate du tube de gélose étant enlevé, l'opérateur porte l'extrémité du fil de platine sur la partie de la surface inclinée la plus voisine du fond du tube, puis la ramène vers l'orifice par un mouvement rectiligne ou légèrement sinueux en frottant la surface de la gélose.

7°-8° Comme en A.

Remarque. — Pour pratiquer les ensemencements sur pomme de terre opérer de même, en ayant soin d'appuyer fortement sur la pomme de terre en traçant la strie, se servir ici de l'öse avec fil de platine moyen ou gros.

C. — **Ensemencements en piqûre.** — Nous décrirons un ensemencement en gélatine :

1° Comme en A en substituant au tube de bouillon stérile un tube de gélatine.

2° Les deux tubes sont disposés dans la main gauche de la façon suivante : le tube semence est placé dans le creux de la main et maintenu presque horizontalement entre le pouce et la pulpe de l'index; le tube de gélatine est maintenu, serré entre la face dorsale de l'index et la face palmaire du médius, en position verticale, son orifice regardant en bas.

3° Saisir l'öse à fil rectiligne à pleine main (main droite) de façon que le pouce et l'extrémité de l'index restent libres. Flamber l'öse.

4°-5° Comme en A.

6° Le bouchon du tube de gélatine est saisi, enlevé et conservé entre le pouce et la pulpe de l'index de la main droite; l'öse chargée de semence est présentée verticalement, de bas en haut, à l'orifice du tube, on pousse l'extrémité du fil de platine jusqu'à la surface de la gélatine, puis on laisse le tube s'abaisser par son propre poids : la gélatine s'empale en quelque sorte sur le fil de platine, quand celui-ci touche le fond du tube on le retire rapidement (fig. 38).

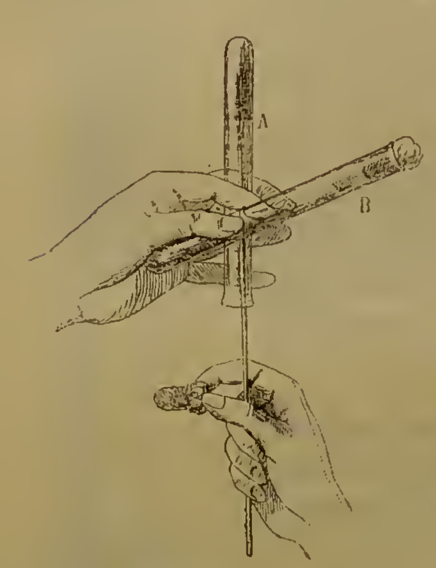


Fig. 38. — Ensemencement en piqûre.

7°-8°-9° Terminer comme en A.

Remarques. — Il importe d'obtenir une piqûre bien droite atteignant le fond du tube et ne venant pas aboutir aux parois latérales, on y arriverait difficilement en *enfonçant* le fil dans la gélatine, la réussite est beaucoup plus aisée en laissant la gélatine *s'empaler* elle-même sur le tube; pour cette opération on ne peut tenir le tube en position oblique, force est donc de le renverser et de le maintenir vertical.

Quand les tubes ont été préparés depuis un certain temps la gélatine se fendille, se crevasse; en pareil cas, il faut avoir soin, au moment de l'ensemencement, de liquéfier la gélatine au bain-marie, puis de la laisser se solidifier de nouveau : le milieu redevient ainsi homogène.

II. — CONDITIONS DE CULTURE.

Les tubes ensemencés doivent être maintenus :

1° A l'abri des poussières atmosphériques et néanmoins au contact de l'air (bouchon d'ouate);

2° A une température constante ;

3° Autant que possible à l'abri de la lumière.

Pour réaliser les deux derniers desiderata on se sert d'étuves que nous étudierons dans le prochain chapitre.

Certains microbes exigent pour se développer des températures supérieures à 30° (ordinairement 37° ou 38°), d'autres au contraire ne cultivent bien qu'au-dessous de 30°, enfin les cultures en gélatine ne peuvent être exposées à une température supérieure à 20° ou 22°.

Dans un laboratoire on devra donc posséder trois étuves : 1° l'une réglée à 20° (étuve à gélatine); 2° une autre réglée à 37°-38°; 3° la

troisième enfin servira suivant les besoins, tantôt pour les cultures qui exigent une température supérieure à 38° (39°-41°), tantôt pour les cultures à des températures comprises entre 20° et 37°.

III. — OBSERVATION DES CULTURES.

Les cultures doivent être examinées chaque jour, et même deux fois dans les vingt-quatre heures ; leurs caractères, notés avec soin, seront d'une grande utilité pour la détermination des bactéries.

Les observations devront porter sur les points suivants :

A. — CARACTÈRES COMMUNS A TOUS LES MILIEUX.

1° *Température optima de culture. — Températures limites.*

2° *Moment de l'apparition de la culture.*

B. — CARACTÈRES DES CULTURES EN BOUILLON.

1° *Forme de la culture;* il peut exister :

a. Un trouble notable, uniforme, ou avec ondes soyeuses, ou avec voile à la surface. Dans ces différents cas il peut se produire à la longue des précipités floconneux. Noter leur présence.

b. Pas de trouble notable. α. Un voile à la surface : voile mince, voile épais, gras, rugueux. β. Des anneaux sur la paroi du tube, à la surface du liquide. γ. Des dépôts floconneux nageant dans le liquide et se précipitant à la longue. δ. De fins dépôts grumeleux, tombant au fond ou adhérents aux parois du tube.

2° *Coloration de la culture ;*

3° *Odeur de la culture;*

4° *Apparition de corps nouveaux* (toxines, indol, acides, ammoniaques composées, etc.).

C. — CARACTÈRES DES CULTURES EN STRIE.

I. — GÉLOSE.

1° *Forme de la culture.* — *a.* Culture localisée à la strie : α. strie mince, transparente, homogène ou constituée par de fines colonies séparées; β. strie épaisse : humide, grasse, visqueuse, sèche, rugueuse.

b. Culture s'étendant à toute la surface : humide, grasse, visqueuse, sèche, rugueuse.

2° *Coloration de la culture.* — Coloration de la strie, de la gélose autour de la strie.

3° *Odeur.*

II. — GÉLATINE.

1°-2°-3° Comme pour la gélose;

4° Noter s'il y a ou non *liquéfaction*, indiquer la date de la liquéfaction.

III. — POMME DE TERRE.

Comme pour la gélose.

D. — CARACTÈRES DES CULTURES EN PIQURE (GÉLATINE).

1° *Forme de la culture.* — *a.* Culture rectiligne;

b. Culture ramifiée, arborisée;

c. Culture en clou : mince, épais, à tête plus ou moins accentuée;

d. Culture limitée à la surface.

2° *Liquéfaction.* — *a.* Sa date;

b. Sa forme cylindrique, en entonnoir, ou en cupule restant partielle ou s'étendant à toute la gélatine.

Noter s'il existe l'apparence d'une *bulle d'air* retenue au sommet de la culture.

3° *Coloration* de la culture, de la gélatine autour de la culture.

4° *Odeur.*

IV. — CONSERVATION DES CULTURES.

Quand le développement d'une culture est terminé, les microbes de celle-ci peuvent se conserver vivants et capables de reproduction pendant un temps variable avec les espèces (de quelques jours à plusieurs mois et même des années), mais à la longue la culture finit par périr et n'est plus susceptible de fertiliser les milieux dans lesquels elle est réensemencée.

Cet affaiblissement et cette disparition de la vitalité sont dus en grande partie à l'action prolongée de l'oxygène de l'air sur la culture, aussi quand on peut conserver à un microbe sa vitalité faut-il avoir soin de le réensemencer fréquemment. On arrive plus rapidement au même résultat en soustrayant les cultures, une fois le développement terminé, à l'influence de l'air; on opère alors de la façon suivante :

1° On prépare une culture en bouillon et on la laisse exposée à la

température optima pendant le temps nécessaire à son développement (temps variable suivant les différents microbes);

2° D'un autre côté, on prend une pipette Pasteur dont on porte

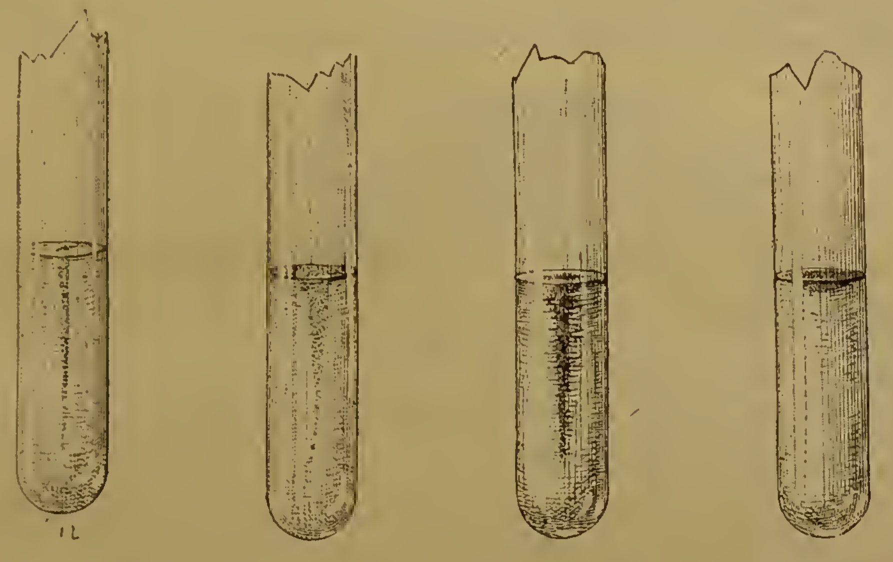


Fig. 39. — Culture en strie rectiligne. Fig. 40. — Culture en clou. Fig. 41. — Culture ramifiée. Fig. 42. — Culture de surface.

Cultures en piqûre sur gélatine.



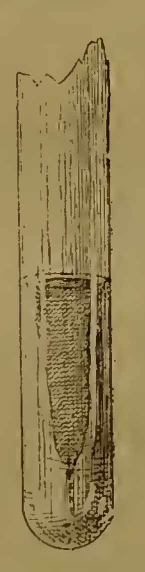




Fig. 43. — Liquéfaction en cupule. Fig. 44. — Liquéfaction en entonnoir. Fig. 45. — Liquéfaction en doigt de gant. Fig. 46. — Liquéfaction cylindrique.

Cultures sur gélatine (liquéfaction).

sur une petite flamme de chalumeau la partie *a* située immédiatement au-dessous du tampon d'ouate; le verre étant ramolli, on étire légèrement de façon à produire l'étranglement représenté dans la figure 47;

3° On laisse refroidir la pipette, puis, avec les précautions ordinaires on la plonge dans la culture et on aspire le liquide jusqu'à ce qu'il atteigne l'étranglement *a* ;

4° La pipette est alors portée rapidement sur la petite flamme du chalumeau et on la scelle aux deux points *a* et *b* : on obtient un

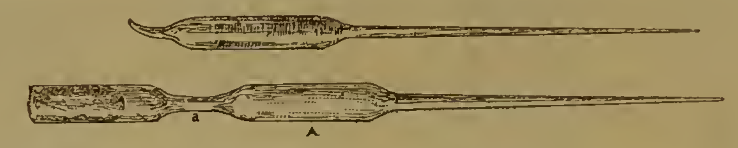


Fig. 47. — Préparation des ampoules pour la conservation des cultures à l'abri de l'air.

petit tube fermé aux deux extrémités et entièrement rempli par la culture.

On peut conserver ainsi pendant très longtemps à la plupart des microbes leur entière vitalité.

CHAPITRE IV

LES ÉTUVES

Comme nous l'avons dit au chapitre précédent, le but capital des étuves est de maintenir les cultures à une température favorable à leur développement.

La *forme* de l'étuve importe peu, d'une manière générale, et devra seulement être appropriée, autant que possible, aux dimensions des objets que l'appareil est destiné à contenir. Les étuves de forme rectangulaire sont les plus commodes ; ce sont celles qui permettent d'utiliser le plus complètement la capacité de l'appareil.

On conçoit qu'une caisse métallique munie d'une porte et chauffée par un brûleur quelconque, puisse à la rigueur être utilisée comme étuve : une boite rectangulaire en cuivre ou en fer-blanc montée sur pieds et chauffée par une veilleuse à huile, plus ou moins éloignée du fond de l'appareil suivant la température qu'on désire obtenir, peut constituer une étuve. Mais avec un tel appareil on ne peut obtenir une température constante; indépendamment de la quantité de chaleur fournie par le brûleur, la température de l'étuve est fonction de la température extérieure. Force a donc été de recourir à des appareils plus compliqués, plus coûteux, mais infiniment plus précis.

Deux principes doivent présider à la construction d'une étuve :

1° Soustraire autant que possible l'appareil aux variations de la température extérieure et réduire au minimum la déperdition de chaleur par rayonnement et par convection;

2° Munir l'étuve d'un régulateur de température automatique aussi sensible que possible.

Les premiers desiderata seront réalisés en entourant l'étuve d'une paroi isolante (bois, feutre, couche d'eau comprise entre deux parois métalliques) ou d'une feuille de cuivre soigneusement polie, les métaux polis ayant la propriété de rayonner très faiblement.

Les régulateurs, enfin, sont très nombreux ; les uns, les seuls re-

commandables selon nous, sont applicables au chauffage par le gaz (1); les autres, au chauffage par les combustibles autres que le gaz; nous ne décrirons que les modèles le plus ordinairement employés.

Une condition indispensable au bon fonctionnement d'une étuve est la *ventilation*. Si l'étuve est constituée par une caisse hermétiquement close, on conçoit que l'air chaud s'accumule à la partie supérieure : il en résulte des variations notables de la température aux différents étages de l'étuve. Il importe de ménager à la partie inférieure et au plafond de l'étuve des trous d'aération permettant la production d'un courant d'air ascendant qui égalise sensiblement la température aux différentes hauteurs de l'appareil.

I. — ÉTUVES CHAUFFÉES AU GAZ.

ÉTUVE DE BABÈS.

Une caisse métallique, protégée par une enveloppe de feutre et chauffée par un brûleur muni d'un régulateur, constitue la plus simple de toutes les étuves, telle est par exemple l'*étuve de Babès* (fig. 48) à laquelle on peut adapter plusieurs sortes de régulateurs.

A. **Régulateurs électriques**. — Type : *régulateur de Babès*. Appareils très compliqués, de fonctionnement aléatoire, ne présentant aucun avantage sur les suivants.

B. **Régulateurs à mercure**. — Type : *régulateur de Chancel*. — Le gaz arrive par le tube en verre A (fig. 49), vient sortir par le bec de flûte qui termine ce tube à l'intérieur du régulateur et passe par l'ajutage B pour se rendre au brûleur. L'appareil étant disposé dans l'étuve, le mercure placé dans la partie inférieure, en R, se dilate sous l'influence de toute élévation de température et vient obstruer plus ou moins complètement le bec de flûte, diminuant ainsi la quantité de gaz qui se rend au brûleur; un trou de sûreté, O, évite l'extinction du gaz en cas d'occlusion complète du bec de flûte.

Dès que l'étuve se refroidit, le niveau du mercure baisse et le gaz passe librement. Une vis V, permet de régler l'appareil en augmentant ou diminuant la capacité du tube plein de mercure. Appareil peu coûteux, mais peu sensible.

C. **Régulateurs à éther**. — Type : *régulateur de Rohrbeck* (fig. 50).

(1) Le bon fonctionnement des régulateurs exige une pression constante du gaz qui les alimente; pour obtenir cette constance, il est bon de faire usage d'un régulateur de pression (celui de Moitessier, par exemple) placé à l'origine de la conduite sur laquelle sont branchées les étuves.

— Le principe de cet appareil est basé sur les modifications de tension de la vapeur d'éther sous l'influence des changements de température.

La figure ci-jointe fait comprendre le fonctionnement du régulateur.

Le gaz arrivant par l'ajutage A passe dans le tube T par le bec de

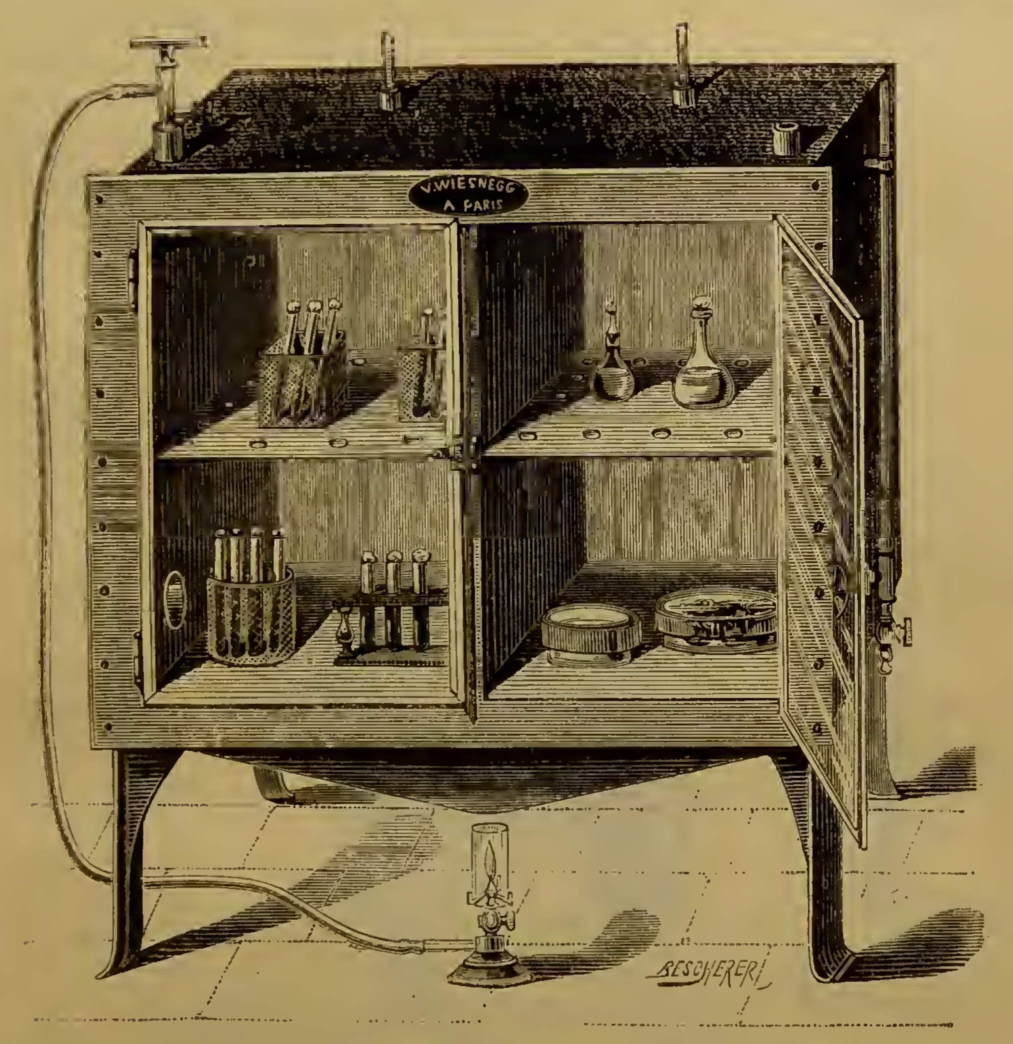


Fig. 48. — Étuve de Babès.

flûte, puis se rend au brûleur par B ; à la partie inférieure du tube T une cloison en verre, en forme d'entonnoir, E, délimite une chambre R, dont la partie inférieure contient du mercure et la partie supérieure des vapeurs d'éther. Toute élévation de la température ambiante augmente la tension des vapeurs d'éther, le mercure refoulé monte dans l'entonnoir et la chambre supérieure où il vient obstruer plus ou moins le bec de flûte et diminuer ainsi l'afflux du gaz au brûleur. Un trou de sûreté empêche l'extinction totale. On

règle l'appareil en enfonçant plus ou moins le tube A dans le bouchon. Appareil sensible, mais fragile.

D. **Régulateurs à air.** — Type : *régulateur de Bohr* (fig. 51). — Le principe de l'appareil est le même que celui du précédent, la vapeur d'éther étant remplacée par de l'air.

Le régulateur est placé dans l'étuve, le réservoir A étant plein d'air, le robinet R ouvert. Quand l'étuve a atteint la température désirée on ferme R.

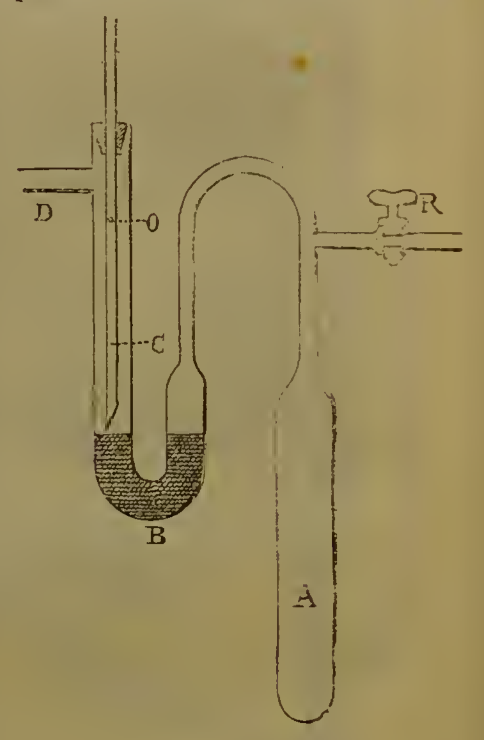


Fig. 49. — Régulateur de Chancel. Fig. 50. — Régulateur de Rohrbeck.

Fig. 51. — Régulateur de Bohr.

Toute nouvelle élévation de température détermine la dilatation de l'air du réservoir, l'air dilaté refoule le mercure contenu en B et le bec de flûte C se trouve obstrué, le gaz ne peut alors parvenir au tube D qui le conduit au brûleur. Un trou de sûreté O empêche l'extinction totale.

Cet appareil assez sensible présente l'inconvénient d'être influencé par les variations notables de la pression atmosphérique et exige de ce fait une certaine surveillance.

ÉTUVE DE D'ARSONVAL.

Le principe du régulateur de d'Arsonval est basé sur les déformations que subit une lame élastique soumise à des pressions différentes.



Fig. 52. — Nouvelle étuve autorégulatrice de d'Arsonval.

L'étuve est en métal et comporte une double paroi, 2, pleine d'eau (fig. 52 et 53). A la partie inférieure la paroi extérieure est formée par une lame flexible, 3, en acier ; cette lame constitue la paroi supérieure d'une chambre, 10, dans laquelle pénètre un ajutage en cuivre, 12, par

lequel arrive le gaz; deux tubes, 13 et 13', assurent la sortie du gaz qui se rend au brûleur.

L'extrémité de l'ajutage 10 peut être rapprochée ou éloignée de la lame 3 au moyen d'un pas de vis; quand cette extrémité se trouve au contact de la lame, le gaz ne peut passer. Éloigne-t-on au contraire le tube de la lame, le gaz circule librement et se rend au brûleur.

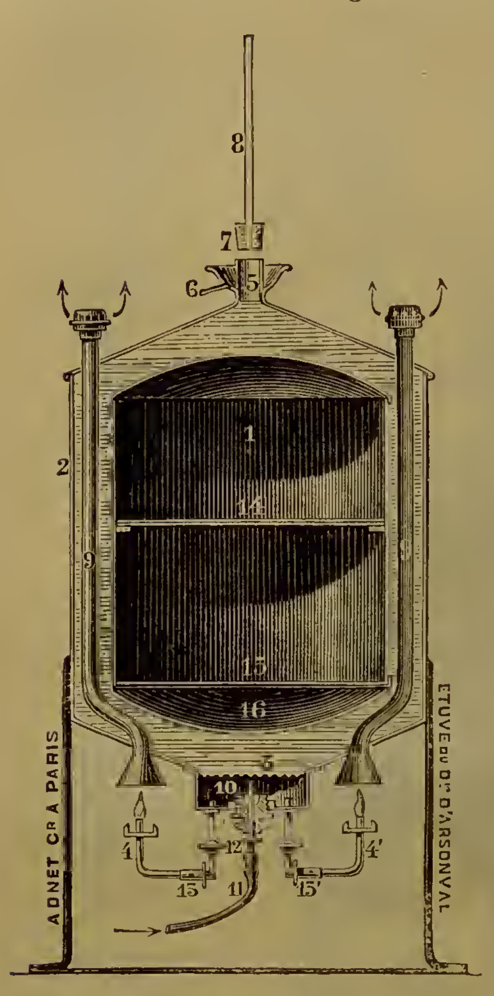


Fig. 53. — Coupe de l'étuve autorégulatrice de d'Arsonval.

La double paroi est remplie d'eau par un orifice, 5; elle est, de toute autre part, hermétiquement close. Supposons que l'on veuille règler l'appareil à 37°, on éloigne le tube 10 de la lame 3 de façon à ce que le brûleur brûle à pleine flamme; quand le thermomètre atteint 36° à l'intérieur de l'étuve, on rapproche le tube 10 de la lame 3 de manière à diminuer légèrement la hauteur de la flamme du brûleur, puis on bouche hermétiquement l'orifice 5; toute nouvelle élévation de température détermine la dilatation de l'eau de la double paroi et par conséquent le refoulement de la plaque 10 et l'interruption du cours du gaz. En réalité on ne ferme pas complètement l'orifice 5, mais on y place un bouchon, muni d'un tube de verre : sous l'influence de la dilatation le liquide monte dans le tube, la pression augmente sur le fond de l'étuve et la lame 3 est refoulée.

Avoir soin de se servir pour le remplissage de l'étuve d'eau récemment bouillie; si l'on employait de l'eau ordinaire, les bulles d'air se dégageant sous l'influence de la chaleur feraient varier le niveau du liquide et l'appareil serait déréglé.

Une modification consiste à placer latéralement le régulateur et à substituer à la lame d'acier une membrane de caoutchouc, plus sensible.

L'appareil que nous venons de décrire présente plusieurs inconvénients :

1° En raison de sa forme il ne permet d'utiliser qu'une petite portion de la capacité de l'étuve;

2° Le réglage étant fonction du niveau de l'eau dans le tube S, la température de l'étuve s'élève à mesure que le niveau baisse d'une faible quantité, ce qui se produit assez fréquemment par évaporation, par suintement au niveau des joints, etc., etc.;

3° Les lames élastiques se fatiguant à la longue perdent de leur élasticité et l'étuve se dérègle.

En résumé, l'étuve de d'Arsonval exige une surveillance assidue et des réparations fréquentes.

ÉTUVE DE ROUX.

L'étuve de Roux (fig. 55) répond à tous les besoins de la technique bactériologique sans présenter les inconvénients des appareils précédents, c'est celle dont l'usage nous paraît le plus recommandable.

Cette étuve se compose d'une armoire rectangulaire en bois, de dimensions variables, fermée à sa partie antérieure par une ou deux portes vitrées et disposée sur des pieds au-dessus d'un brûleur à gaz. L'étuve contient une série de tubes de cuivre disposés verticalement contre la face interne des parois du bois.

Les gaz de combustion dégagés par le brûleur s'engagent dans les tubes et ceux-ci déterminent par rayonnement un échauffement uniforme de l'air contenu dans l'appareil; la ventilisation est assurée par des orifices ménagés à la partie inférieure et dans le plafond de l'étuve.

Le régulateur est entièrement métallique (fig. 56), il est constitué par une lame de zinc et une lame d'acier soudées ensemble et recourbées en forme d'U. Le métal le plus dilatable, le zinc, étant en dehors, toute élévation de température tend à rapprocher les deux branches et tout abaissement les écarte l'une de l'autre.

La branche gauche de l'U étant fixée, la branche R restée libre totalise les déformations provoquées par l'élévation ou l'abaissement de la température de l'étuve et par l'intermédiaire d'une tige rigide horizontale les transmet au piston C qui commande l'arrivée du gaz et qui est placé extérieurement.

Le gaz, en effet, arrive par le tube A relié au robinet de la conduite, et pour pénétrer dans l'ampoule d'où part le tube S qui le conduit au brûleur il doit passer au-dessous du piston C.

Lorsque la température s'élève dans l'étuve, la branche R se rapproche de l'autre entraînant avec elle la tige rigide; le ressort sollicité par un ressort à boudin, se ferme (position indiquée par la

figure), ne laissant pour tout passage au gaz qu'un trou de sûreté ou rallumeur *t*, de suite la température s'abaisse. Quand la température de l'étuve est trop basse, le phénomène inverse se produit, la tige

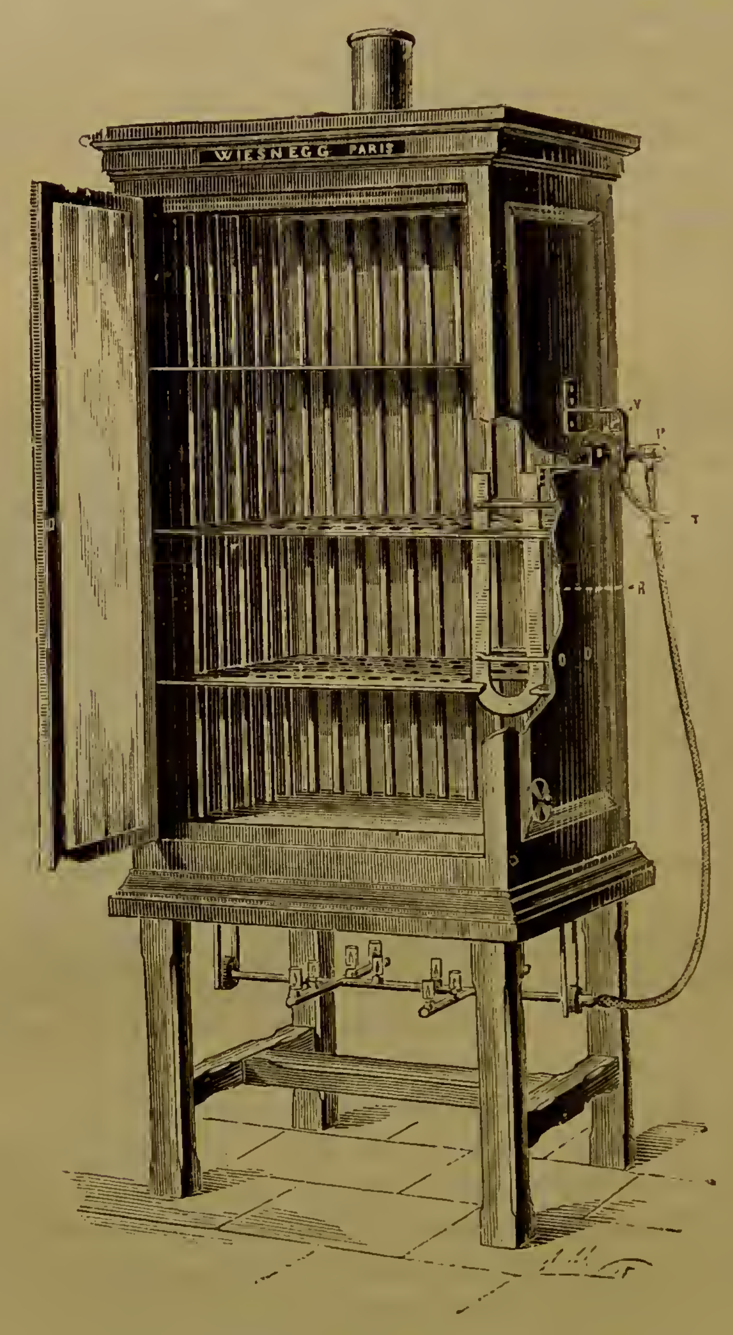


Fig. 54. — Étuve de Pasteur modifiée par Roux.

rigide est refoulée par la branche R, elle repousse le piston C qui donne alors passage au gaz et la flamme du brûleur augmente d'intensité ; après quelques oscillations au-dessus et au-dessous de la température de régime, l'étuve est définitivement réglée. On peut

ıcilement faire varier en plus ou en moins la température : il suffit our cela d'augmenter ou de diminuer la longueur de la tige gide T, ce qu'on obtient facilement en tournant ou détournant la is V.

Dans un autre modèle, qui permet d'obtenir une plus grande récision dans le réglage, la longueur de la tige rigide est invariable,

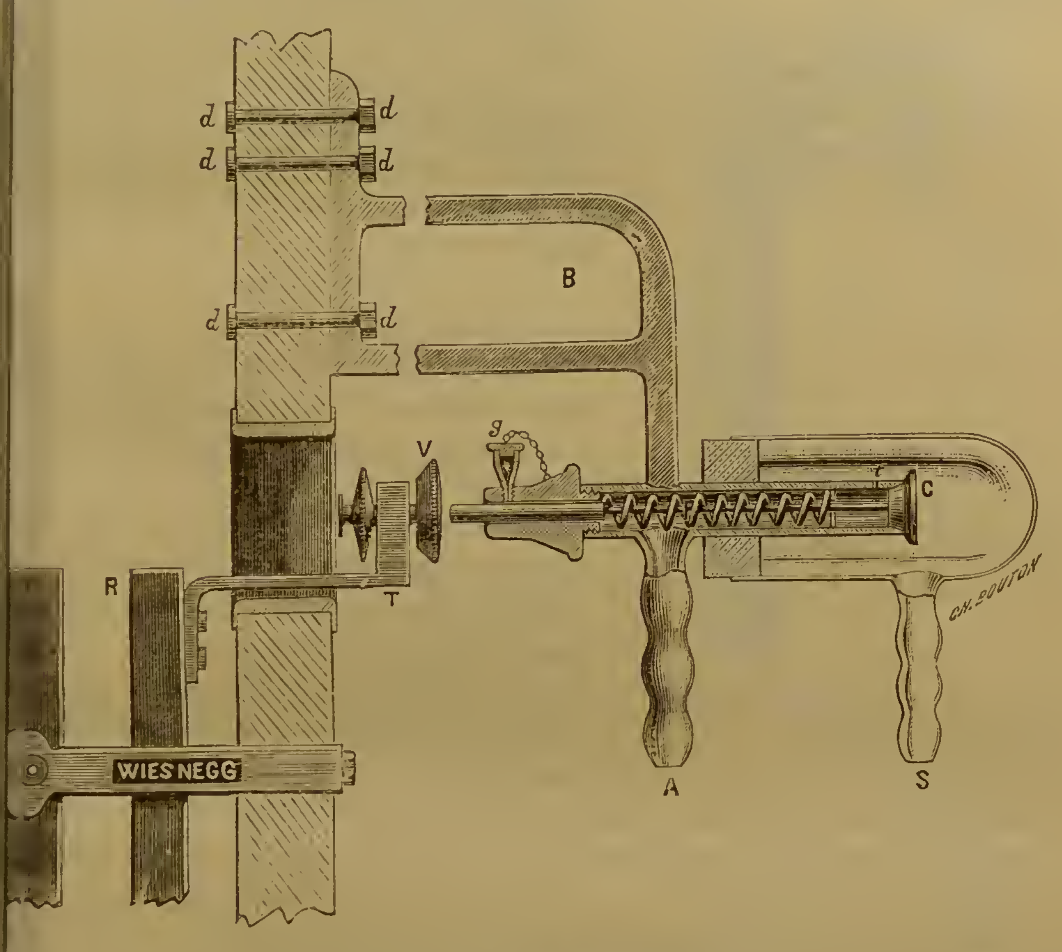


Fig. 55. — Régulateur métallique de Roux.

nais on en approche ou on éloigne plus ou moins le piston au noyen de la vis de rappel V actionnée par un ressort à boudin (fig. 56).

Dans certains cas les tiges de fer et de zinc sont rectilignes et 'appareil a la forme d'un tube métallique B ; on emploie ce modèle orsque le régulateur doit être immergé dans l'eau (étuve à manchon l'eau, bains-marie, étuves à gélatiniser le sérum, etc.) (fig. 56).

On peut enfin adapter un régulateur de Roux à un poêle à gaz et chauffer ainsi une pièce entière qui servira de grande étuve, soit lans les laboratoires où travaillent de nombreux élèves, soit pour la abrication des toxines.

Mise en fonctionnement. — 1° Avant d'utiliser l'étuve il est bon de garnir la face intérieure des portes vitrées avec du papier noir pour protéger les cultures contre l'action nocive de la lumière ;

2° Placer un thermomètre à chaque étage de l'étuve pour y étudier la marche de la température. L'étuve réglée, chaque étage a une température absolument fixe, mais il existe des différences minimes de température entre les différents étages ;

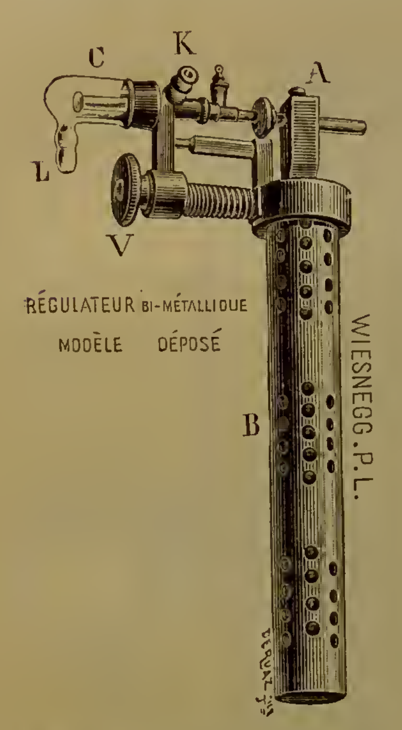


Fig. 56. — Régulateur de Roux à tube.

3° L'ajutage A (fig. 55) étant relié au robinet de la conduite et le tube S au brûleur, amener la vis V au contact de la tige qui commande la soupape S et la faire tourner jusqu'à ce que la soupape soit largement ouverte ;

4° Allumer le brûleur ;

5° Quand le thermomètre de l'étage moyen marque à un demi-degré près la température que l'on désire obtenir (36°,5 pour régler à 37° par exemple), on détourne la vis V jusqu'à ce qu'elle affleure simplement, sans la repousser, la tige de la soupape : la soupape se trouve alors fermée, le brûleur n'est plus alimenté que par le trou de sûreté. Mais dès que la température baisse dans l'étuve, la branche B s'écarte de sa congénère, la vis V refoule le piston, la soupape s'ouvre et le gaz arrive en plus grande quantité au brûleur. L'appareil se trouve réglé.

Dès lors la température se maintient constante, sans qu'on ait plus à s'occuper du régulateur; on peut éteindre l'étuve en fermant le robinet de la conduite du gaz, puis la rallumer; la température se rétablit d'elle-même au degré fixé. Avoir soin, à de longs intervalles, de déposer un peu de vaseline dans le graisseur *g* pour lubréfier la tige du piston.

II. — ÉTUVES CHAUFFÉES AVEC UN COMBUSTIBLE AUTRE QUE LE GAZ.

Quand on ne dispose pas de gaz d'éclairage, il est très difficile d'obtenir une bonne régulation des étuves.

L'*étuve de Lion*, au pétrole, est quelquefois employée.

Viesnegg construit deux modèles qui permettent d'utiliser un combustible quelconque. Dans le premier, l'étuve est chauffée directement par le foyer; un régulateur de Roux actionnant une conduite d'eau permet l'arrivée de l'eau froide dans la double paroi de l'étuve dès que la température s'élève au-dessus du degré de régime; dans un second appareil, la source de chaleur est placée sous une chaudière voisine de l'étuve et reliée à celle-ci par un tuyautage commandé par un régulateur de Roux : dès que la température de l'étuve s'abaisse, le fonctionnement du régulateur permet l'introduction d'eau chaude dans la double paroi. Nous n'insisterons pas sur le fonctionnement de ces appareils d'utilisation peu fréquente.

CHAPITRE V

ISOLEMENT DES GERMES

L'obtention d'une culture pure est la première condition des recherches bactériologiques : pour étudier le mode de développement et les propriétés d'un microbe, il faut commencer par l'isoler des autres germes, des *impuretés*, auxquels il peut se trouver mélangé.

Étant données les petites dimensions des microbes, on ne peut songer à prélever isolément un de ces êtres pour le reporter dans un milieu de culture, force est donc de recourir à des procédés plus compliqués.

Les méthodes d'isolement employées en bactériologie sont nombreuses ; pour la commodité de l'étude, on peut les ramener à deux groupes. Les premières sont d'ordre purement mécaniques, elles comportent la *dilution* et la *dissémination* ; les secondes utilisent les *propriétés biologiques* du microbe qu'on se propose d'isoler.

Les procédés du premier groupe conviendront pour isoler toutes les espèces bactériennes que contient un produit donné ; les procédés biologiques, au contraire, s'appliquent spécialement à la recherche de tel ou tel microbe que l'on présume exister dans le produit mis en expérience et dont on connaît à l'avance les propriétés capitales.

Avant tout, quand on se propose de pratiquer un isolement, il faut distinguer les microbes *aérobies* des *anaérobies* ; suivant que l'on se propose d'obtenir les bactéries du premier ou de second groupe, on fera les cultures en présence ou à l'abri de l'air.

Dans les cultures à l'abri de l'air on isolera les différents microbes anaérobies par les procédés que nous étudierons dans le chapitre suivant. Pour le moment nous nous occuperons uniquement de la séparation des microbes aérobies.

I. — PROCÉDÉS MÉCANIQUES.

A. — DILUTION DANS LES LIQUIDES.

Ce procédé, imaginé par Lister, a été appliqué par Nœgeli et par Miquel; il est peu employé aujourd'hui. Soit à isoler les microbes contenus dans une goutte d'eau. Portons cette goutte d'eau dans un tube contenant 10 centimètres cubes de bouillon stérile (tube A) et mélangeons par agitation. Les germes que renfermait la goutte d'eau se trouvent dilués dans les 10 centimètres de bouillon; un centimètre correspond à 20 gouttes, chaque goutte de bouillon contiendra 20×10, c'est-à-dire 200 fois moins de germes que la goutte d'eau mise en analyse.

Reportons maintenant une goutte du mélange (tube A) dans un nouveau tube de bouillon stérile et répétons cette opération avec un certain nombre de tubes (B, B', B'', etc.). Si notre goutte d'eau contenait 200 germes, chaque goutte du tube A contenait $\frac{200}{200} = 1$ germe, le microbe unique se développera dans chacun des tubes B, B', B'', etc., et donnera une culture pure.

La goutte d'eau ne contenait-elle que 50 germes, un tube sur 4 donnera une culture; la goutte d'eau renferme-t-elle un plus grand nombre de germes, il sera nécessaire de la diluer davantage de façon à arriver à un mélange dont une goutte ne contienne plus qu'un germe, on portera par exemple 10 gouttes du tube A dans un tube de bouillon B avec lequel on pratiquera une série d'ensemencement C, C', C'', etc.

Ce procédé d'isolement est très rigoureux, mais il a l'inconvénient d'être long et pénible, aussi lui préfère-t-on d'ordinaire la méthode suivante.

B. — DISSÉMINATION.

L'isolement des germes par dissémination, imaginé par Koch, exige l'emploi de milieux de culture solides. Ce procédé peut être utilisé suivant deux modes différents : tantôt on ensemence le milieu préalablement liquéfié, tantôt on répartit directement les germes à la surface de milieu solide.

1° DISSÉMINATION EN MILIEUX SOLIDES LIQUÉFIÉS.

Soit à isoler les germes contenus dans une goutte d'eau. Nous portons cette goutte d'eau dans un tube de gélatine liquéfiée au

bain-marie et nous mélangeons intimement. Les germes de la goutte d'eau se répartissent dans la gélatine; coulons maintenant cette gélatine en couche mince sur une plaque de verre et refroidissons-



Fig. 57. — Aspect de colonies microbiennes sur plaque de gélatine grandeur naturelle.)

la rapidement : les microbes se trouvent disséminés et enrobés dans la couche de gélatine comme les amandes dans la pâte d'un nougat; si nous exposons la plaque à une température favorable, chaque microbe germera isolément et donnera naissance à une colonie

constituée par des individus provenant du germe unique initial, et par conséquent pure. Il sera aisé dès lors de reprendre chacune de ces colonies et de les réensemencer sur des milieux neufs.

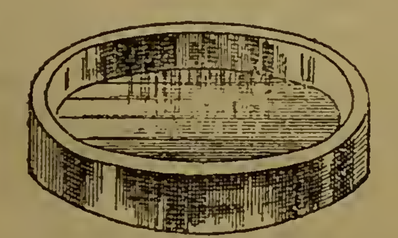
La mise en pratique de ce procédé peut être réalisée de différentes façons, mais elle est toujours subordonnée aux règles suivantes :

1° Avant que d'y déposer la semence laisser refroidir la gélatine liquéfiée, suffisamment (30° à 40°) pour que les microbes ensemencés ne soient pas détruits par la température du milieu.

2° Opérer à l'abri de toute contamination.

3° Placer les plaques à l'abri des poussières atmosphériques.

a. **Procédé recommandé. — Boîtes de Petri.** — *Instruments nécessaires.* — Trois boîtes de Petri (fig. 58) enveloppées de papier



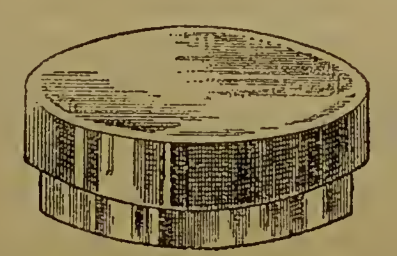


Fig. 58. — Boîtes de Petri.

filtre, puis flambées au four Pasteur (avoir une provision de ces boîtes préparées d'avance);

Trois pipettes de Pasteur;

Trois tubes de gélatine.

Opération. — 1° Liquéfier au bain-marie la gélatine des trois tubes.

Ne jamais exposer directement les tubes à la flamme pour liquéfier la gélatine; il se produirait dans le milieu des bulles d'air qui gêneraient les observations ultérieures.

2° Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, en prenant les précautions d'usage (Voy. p. 58), une goutte du liquide dont on veut isoler les germes.

Porter cette goutte dans un tube de gélatine (tube I) en observant les règles ordinaires; replacer le bouchon d'ouate du tube et assurer le mélange exact en roulant rapidement le tube entre les deux mains.

Ne jamais mélanger en agitant le tube de haut en bas comme on le fait en chimie, la gélatine produirait ainsi une mousse fort gênante.

3° Avec une nouvelle pipette Pasteur, prélever 3 gouttes dans le tube I et les reporter dans le second tube de gélatine liquéfiée (II); mélanger comme plus haut.

4° Prélever de même 3 gouttes du tube II et les ensemencer dans le troisième tube de gélatine (III).

On obtient ainsi trois dilutions différentes de la semence ; suivant que celle-ci contenait beaucoup ou peu de germes, la dilution III ou la dilution I donneront les résultats les plus favorables. S'il y a beaucoup de germes, par exemple, leur abondance rendra les colonies confluentes et gênera l'isolement sur la plaque préparée avec la dilution I : on se reportera alors aux dilutions II et III.

5° Débarrasser une boîte de Petri de son enveloppe de papier.

Déboucher purement le tube I, en flamber l'orifice dans un bec de Bunsen.

Soulever le couvercle de la boîte de Petri, couler la gélatine dans la boîte, replacer rapidement le couvercle.

Communiquer quelques oscillations à la boîte pour bien répartir la gélatine sur la totalité du fond du cristallisoir, puis déposer la boîte sur une surface horizontale et froide et laisser la solidification se produire. Cela fait, étiqueter et placer à 20°.

6° Opérer de même pour les tubes II et III.

7° Examiner chaque jour les boîtes, noter le développement des colonies, leurs caractères (examen à l'œil nu et à la loupe à travers la paroi de verre de la boîte) ; enfin prélever avec un öse un échantillon de chaque colonie pour les examens microscopiques et les réensemencements.

Remarque. — Cette méthode présente quelques inconvénients et ne peut être appliquée dans tous les cas :

a. Certains microbes liquéfient rapidement la gélatine, l'isolement se trouve ainsi compromis et interrompu.

b. Ce procédé ne convient qu'aux bactéries cultivant à des températures inférieures à + 20° ou 23°, la gélatine se liquéfiant à + 25°.

Aussi a-t-on recours dans certains cas, et particulièrement dans la recherche des bactéries pathogènes, aux plaques préparées avec la *gélose*.

On opère alors comme précédemment en tenant compte des observations suivantes :

1° La gélose solidifiée ne se liquéfie qu'à la température de l'ébullition, mais elle reste alors liquide jusqu'à + 40°. Les tubes de gélose seront donc liquéfiés dans l'eau bouillante, puis on les laissera refroidir jusqu'à ce que leur température soit aisément supportée par la main.

2° Ensemencer alors les tubes comme il a été dit plus haut, mais opérer très rapidement pour la confection des boîtes, sans quoi la gélose se solidifierait et formerait des grumeaux dans les tubes.

Il est bon pour éviter la production de grumeaux lors du refroidissement dans les boîtes de placer celles-ci, avant que d'y verser la gélose, sur une platine contenant de l'eau à 40°-45° (voy. plus bas) et de ne les laisser refroidir que progressivement.

3° Placer les boîtes à l'étuve à 37°; pour empêcher la dessiccation de la gélose, disposer les boîtes dans une chambre humide constituée par un cristallisoir à cloche dans le fond duquel on dispose une feuille de papier filtre imbibée d'eau.

On pourrait opérer de même avec l'*agar-gélatine* pour les cultures devant être maintenues entre + 20° et + 30°.

b. **Plaques de Koch.** — *Instruments.* — Trois lames de verre mesurant environ 8° × 12°, enveloppées séparément dans du papier et stérilisées au four Pasteur (tenir préparée une provision de ces plaques).

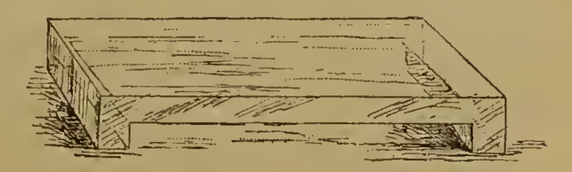


Fig. 59. — Banc de verre pour culture sur plaques.

Trois bancs en verre destinés à supporter les lames.

Un cristallisoir à cloche constitué par deux cristallisoirs d'environ 20 centimètres de diamètre, s'emboîtant l'un dans l'autre.

Une table refroidissante constituée par une boîte métallique plate dont la face supérieure est soigneusement dressée et recouverte par une cloche C; la boîte est supportée par des vis calantes; par les

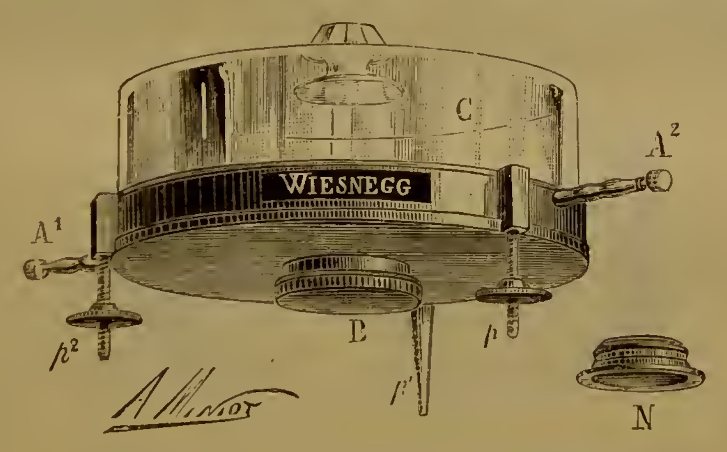


Fig. 60. — Appareil pour plaques de gélatine.

deux ajutages A et A² on peut y faire circuler un courant d'eau froide (ou chaude quand on opère avec la gélose) et une ouverture à vis B permet d'y introduire des morceaux de glace. Un niveau d'eau N sert à donner à l'appareil une position horizontale.

Trois tubes de gélatine liquéfiée au bain-marie et trois pipettes Pasteur.

Opération. — 1° Verser dans le cristallisoir à cloche une petite quantité de la solution de sublimé acide et en renversant et agitant l'appareil assurer le contact du sublimé avec tous les points de ses parois intérieures.

Disposer alors dans le fond du cristallisoir une rondelle préparée avec deux ou trois doubles de papier filtre et imbibée de la solution de sublimé. (Cette disposition, dite *chambre humide*, a pour but d'empêcher la dessiccation des plaques de gélatine.)

Laver également les bancs de verre avec le sublimé, placer un de ces bancs sur le fond du cristallisoir.

2° Disposer horizontalement sur la table (à la gauche de l'opérateur) la platine refroidissante pleine d'eau froide ou glacée.

Le plateau supérieur de l'appareil est essuyé avec soin pour le débarrasser de toute poussière, l'intérieur de la cloche est lavé au sublimé.

3° Ensemencer les trois tubes de gélatine I, II, III comme il a été dit pour le procédé précédent.

4° Prendre une des plaques de verre, déchirer le papier qui l'entoure suivant un de ses bords, saisir un coin de la plaque entre le pouce et l'index de la main droite, la dégager vivement du papier et la porter sur la platine refroidissante dont la cloche est légèrement soulevée par la main gauche de l'opérateur; laisser retomber la cloche au-dessus de la plaque.

5° Déboucher aseptiquement le tube III, passer dans la flamme sa partie supérieure sur une hauteur de 2 à 3 centimètres, l'engager sous la cloche de verre légèrement soulevée ; verser la gélatine au

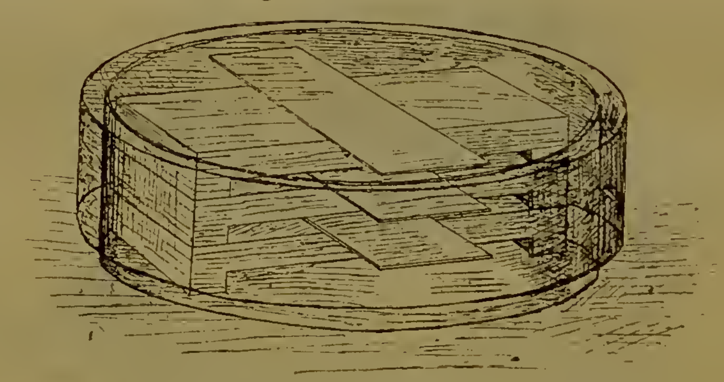


Fig. 61. — Disposition des plaques dans le cristallisoir.

centre de la plaque, l'y étendre largement à l'aide de la partie flambée du tube. Retirer le tube, reposer la cloche, attendre la solidification de la gélatine.

6° La solidification achevée, soulever de nouveau la cloche, saisir avec la main droite un des coins de la plaque, retirer celle-ci de dessous la cloche, la porter vivement dans la chambre humide (dont le couvercle

est soulevé par la main gauche de l'opérateur qui vient d'abandonner la cloche de la platine) et la déposer sur le banc du verre.

Placer immédiatement le second banc de verre, en pont, au-dessus de la plaque humide, laisser retomber le couvercle de la chambre.

La gélatine de la plaque n'a jamais aucun contact ni avec la paroi de la chambre humide ni avec les bancs de verre : c'est pourquoi le sublimé peut être employé pour la stérilisation de ces appareils.

7° Préparer de même une plaque avec tube II, la placer dans la chambre humide, disposer au-dessus le troisième banc.

8° Terminer en préparant une plaque avec le tube I, la placer sur le troisième banc.

9° La chambre humide est maintenue à + 20°. Les plaques ont été disposées dans cette chambre de façon que la plaque la plus chargée en germes se trouve à la partie supérieure : c'est sur elle que les premières colonies apparaîtront ; on pourra l'examiner et l'étudier sans toucher aux autres plaques que l'on ne découvrira qu'à mesure de leur développement.

Inconvénients. — 1° Ce procédé, assez élégant, a l'inconvénient d'exiger des manipulations compliquées, difficiles à exécuter rigoureusement.

2° Les plaques pendant ces manipulations sont nécessairement exposées pendant quelques secondes à l'air et peuvent se contaminer ; cette exposition a peu d'inconvénients si on opère très rapidement dans une atmosphère calme ne contenant pas de poussières en mouvement.

3° Pour examiner les plaques on est forcé de les découvrir et de les exposer à l'air, elles se contaminent rapidement et l'observation perd sa rigueur.

c. **Tube d'Esmark.** — *Instruments.* — Trois pipettes de Roux.

Trois tubes de gélatine ; ces tubes doivent être un peu plus longs et un peu plus larges que les tubes à culture ordinaire ; chacun renferme 10 centimètres cubes de gélatine stérile.

Trois capuchons en caoutchouc.

Opération. — 1° Ensemencer les trois tubes I, II, III, comme il a été dit plus haut.

2° Couvrir l'orifice de chaque tube, au-dessus du bouchon d'ouate, avec un capuchon de caoutchouc.

3° Porter successivement chaque tube au-dessous d'un robinet d'eau froide, incliner le tube de telle sorte que la gélatine se répartisse sur toute sa longueur (sans atteindre le bouchon d'ouate) et lui imprimer un mouvement rapide de rotation en maintenant les deux extrémités entre le pouce et l'index de chaque main. La gélatine se solidifie en

formant un revêtement régulier sur toute la surface interne du tube, on obtient une plaque enroulée en cylindre.

4° La solidification terminée, retirer le capuchon de caoutchouc et porter les tubes à l'étuve à + 20°.

Ce procédé a le grand avantage de soustraire complètement les plaques à toute cause de pollution, mais l'étude des colonies est rendue peu aisée par la forme cylindrique de la plaque de gélatine.

2° DISSÉMINATION A LA SURFACE DES MILIEUX SOLIDES.

Quand on désire isoler les microbes contenus dans un corps solide tel qu'une fausse membrane, un crachat visqueux, etc., on badigeonne avec ce corps la surface d'un milieu nutritif solide disposé soit en plaque, soit en tube incliné.

Ce procédé, classique aujourd'hui pour l'isolement du bacille diphtéritique dans les fausses membranes, permet d'utiliser pour l'isolement des milieux nutritifs non liquéfiables par la chaleur : pomme de terre, sérum, par exemple.

En pratique on peut opérer de deux façons différentes :

a. **Ensemencement en strie.** — Nous prendrons comme type un isolement sur plaque de gélose.

Instruments. — Öse de platine avec fil moyen ou fort.

Un tube de gélose.

Une boîte de Petri stérilisée.

Opération. — 1° Liquéfier la gélose et la couler dans la boîte de Petri en observant les règles formulées plus haut.

Laisser la gélose se solidifier complètement.



Fig. 62. — Isolement sur plaque par la méthode des stries.

2° La solidification achevée, prendre avec l'öse de platine une parcelle du produit à ensemencer. Soulever le couvercle des boîtes de Petri, porter l'öse sur la surface de la gélose et couvrir celle-ci d'une série de stries rectilignes éloignées de quelques millimètres l'une de l'autre, sans jamais recharger l'öse.

A chaque strie, l'öse abandonne un peu de la semence qu'elle porte avec elle, on conçoit que bientôt les stries ne seront plus ensemencées qu'avec un très petit nombre de microbes.

3° La plaque étant portée à l'étuve à + 37°, les colonies se développent très abondantes au niveau des premières stries, de plus en plus rares et bien isolées au niveau des dernières : l'observation et le prélèvement sont ainsi rendus très aisés.

b. **Ensemencement en surface.** — Nous décrirons un isolement sur sérum incliné; opérer de même sur gélose, sur pomme de terre, etc.

Instruments. — Öse forte aplatie en palette.

Trois tubes de sérum solidifié incliné.

Opération. — 1° Prendre avec l'öse une petite quantité du produit à ensemencer.

2° Déboucher purement un tube de sérum, porter l'extrémité de l'öse sur la partie la plus reculée de la surface du sérum, puis la ramener vers l'orifice du tube en la promenant transversalement de manière à badigeonner la totalité de la surface du sérum (tube I).

3° Reporter immédiatement l'öse, sans la recharger, sur le second tube et opérer comme en 2 (tube II).

4° Répéter l'opération précédente sans recharger l'öse, sur le dernier tube (III).

5° Porter ces tubes à l'étuve à 37°.

Au cours de ces opérations l'öse s'essuye peu à peu et se dépouille progressivement des microbes dont elle était chargée : sur le tube I se développeront des colonies nombreuses et confluentes, mais ces colonies seront de plus en plus rares et bien isolées sur le sérum des tubes II et III, c'est sur ces deux derniers tubes qu'on les observera.

II. — PROCÉDÉS BIOLOGIQUES.

Les méthodes d'isolement basées sur les propriétés biologiques des microbes ne peuvent être utilisées que lorsqu'on se propose de rechercher et d'isoler un germe donné ; on utilise alors certaines propriétés, connues à l'avance, de ce germe pour placer celui-ci dans des conditions les plus favorables à son développement, tout en l'opposant à la culture des autres microbes qui existent avec lui dans la semence.

La séparation des *aérobies* et des *anaérobies* rentre dans cette catégorie de procédés d'isolement : ici on utilise la propriété des aérobies de ne pouvoir se passer d'oxygène libre pour les éliminer dans les cultures faites à l'abri de l'air.

Nous devons passer en revue les procédés les plus fréquemment utilisés.

1° DESTRUCTION PAR LA CHALEUR DES GERMES COEXISTANTS.

Les bactéries non sporulées périssent rapidement quand elles sont exposées en milieu liquide à une température voisine de 60° ; au contraire les microbes pourvus de spores supportent sans incon-

vénient des températures de 80°, 90°, 100° et même 105° pendant plusieurs minutes.

Il sera facile dès lors de séparer des bactéries sporulées d'un mélange où entrent des microbes asporulés; il suffira de soumettre pendant quelques minutes le mélange à une température comprise, suivant la résistance de la spore à isoler, entre 80° et 105°, puis de l'ensemencer dans un tube de bouillon. C'est ainsi qu'on pourra purifier une culture sporulée impure de *B. anthracis* en la soumettant pendant cinq minutes à une température de 80° à 85°; l'infusion de foin, portée dix minutes à l'ébullition, donnera une culture pure du *bacillus subtilis*; une infusion préparée de même avec des fragments de pomme de terre, mise à l'étuve pendant deux ou trois jours puis soumise pendant cinq minutes à une température de 105°, donnera une culture pure de *B. de la pomme de terre*, etc...

Pour utiliser ce procédé il faut avoir soin de toujours opérer avec un *mélange liquide*, les microbes desséchés ou protégés par des particules solides résistant beaucoup mieux à l'action de la chaleur; de plus il faut veiller à ce que toutes les parties de la culture soient soumises à la température choisie, sans quoi quelques bactéries pourraient échapper à l'action destructive de la chaleur et l'opération ne donnerait aucun résultat. En règle, il faudra prendre les précautions suivantes :

1° Préparer une pipette Pasteur étranglée au-dessous de l'ouate (Voy. p. 68). Cette pipette doit être de petit diamètre.

2° Aspirer la culture dans la pipette de façon à la remplir jusqu'à l'étranglement, sceller dans une petite flamme l'effilure et l'étranglement.

3° Immerger complètement le tube clos ainsi préparé dans un bain-marie, porter à la température choisie, maintenir cette température cinq à dix minutes suivant le cas, puis retirer le tube (pour les températures supérieures à 100° se servir de l'autoclave).

4° Essuyer le tube, flamber et briser entre les mors d'une pince une de ses extrémités, aspirer purement un peu de son contenu avec une pipette stérile et pratiquer les ensemencements définitifs.

2° CULTURES A LA TEMPÉRATURE OPTIMA ET CULTURES FRACTIONNÉES.

Certains germes se développent à toutes les températures comprises entre + 10° et + 40°, mais la plupart des microbes présentent des températures limites de culture beaucoup moins élastiques; c'est ainsi qu'un grand nombre de saprophytes ne poussent plus au-dessus

de 30°, au contraire beaucoup de bactéries pathogènes présentent leur maximum de développement entre 30° et 40°, certaines ne pouvant cultiver au-dessous de 36°; d'autres encore se développent à 43°, température qui arrête la multiplication de la plupart des microbes. On applique ces propriétés à l'isolement des germes; on peut, par exemple, isoler le *bacterium coli* des matières fécales en ensemençant celles-ci dans un tube de bouillon maintenu à 43°; le *bacterium coli* et le *bacille typhique* seuls se développent dans ces conditions (Rodet). Mais ce procédé ne donne pas du premier coup une culture pure : les germes qui coexistaient dans la semence avec le bacterium coli n'ont pas été détruits; ils ne sont pas développés tant que la culture est restée à 43°, mais ensemence-t-on un peu de cette culture dans un tube de bouillon maintenu à 37°, ils trouveront des conditions favorables à leur développement et envahiront le bouillon. Pour les éliminer complètement il faut recourir aux *cultures fractionnées :* dès que le bouillon du premier tube exposé à 43° est trouble, on en prélève avec une öse une trace au moyen de laquelle on ensemence un nouveau tube II que l'on expose aussi à la température de 43°; ce tube II servira à ensemencer de même un nouveau tube III ; après plusieurs passages ainsi répétés on obtient une culture pure.

On opère d'une façon analogue pour isoler le bacille virgule des selles cholériques, mais on combine à l'action de la température (37°-38°) celle d'un milieu spécial (voir plus bas) et la pratique des cultures fractionnées. Ce procédé peut être employé pour éliminer dans la plupart des cas les bactéries saprophytes.

3° CULTURES EN MILIEUX APPROPRIÉS.

On assure le développement d'un microbe aux dépens de celui des germes qui l'accompagnent en pratiquant l'ensemencement dans un milieu convenant spécialement à ce microbe.

C'est ainsi que l'on isole le *bacille diphtéritique* en pratiquant la dissémination de la membrane sur des tubes de sérum ; l'isolement est favorisé par ce fait que le sérum est très apte au développement du *bacille de Löffler* et convient mal aux microbes qui accompagnent d'ordinaire ce bacille.

Pour la recherche du vibrion du choléra, *Koch* et *Metchnikoff* ont recommandé des milieux spéciaux, peu nutritifs, mais convenant bien au vibrion. On ensemence un peu de matière riziforme dans un tube de milieu gélo-pepto-sel, par exemple (Voy. p. 30), que l'on maintient à 38° : le vibrion ne tarde pas à se développer tandis que la culture des autres bactéries est beaucoup plus lente à se produire.

Le vibrion très aérobie forme un *voile* à la surface du liquide; prélève-t-on un peu de ce voile vers la douzième heure après l'ensemencement, on se trouve en présence d'une culture de vibrions *presque pure*. Pour arriver à la purification complète il faut recourir aux cultures fractionnées (trois passages suffisent d'ordinaire) et l'on peut terminer en pratiquant un isolement en plaque de gélatine, comme il est dit page 83.

Dans d'autres cas, enfin, on arrête le développement des microbes à éliminer en ajoutant au milieu de culture un antiseptique dépourvu d'action sur le germe qu'on veut isoler.

C'est ainsi que Chantemesse a recommandé les milieux phéniqués pour isoler le *bacterium coli* et le *bacille d'Eberth* et qu'Elsner a proposé dans le même but la gélatine à l'iodure de potassium.

On peut combiner cette méthode avec celle de la culture à la température optima : c'est ce qu'a fait Vincent pour la recherche du *bacille typhique*.

4° INOCULATION A L'ANIMAL.

Étant donné un mélange contenant un microbe pathogène qu'on se propose d'isoler, on peut facilement obtenir ce microbe à l'état de pureté en inoculant le mélange à un animal approprié.

Pour isoler le *pneumocoque* dans des crachats pneumoniques, par exemple, on inocule un peu de ces crachats sous la peau d'une souris; l'animal ne tarde pas à succomber et son sang contient le microbe en culture pure.

De même, pour isoler le *vibrion septique* d'une terre où il est mélangé à un grand nombre d'autres microbes, on délaye un peu de cette terre dans quelques gouttes d'eau stérile et on injecte le tout sous la peau de l'abdomen d'un cobaye; l'animal succombe à la septicémie de Pasteur et son péritoine contient un exsudat séreux dans lequel on trouve le vibrion en culture pure.

Au cours de cet ouvrage nous aurons l'occasion d'étudier de nombreuses applications de cette méthode d'isolement des germes.

CHAPITRE VI

CULTURE DES MICROBES ANAÉROBIES

Depuis que Pasteur a démontré l'existence d'organismes inférieurs pouvant vivre et se multiplier sans oxygène libre, la technique des cultures de ces êtres anaérobies a été étudiée et perfectionnée par un grand nombre de savants et particulièrement par Roux.

Certains microbes sont indifféremment aérobies ou anaérobies (*anaérobies facultatifs*), d'autres ne sont susceptibles de se développer que dans un milieu strictement privé d'oxygène libre (*anaérobies stricts*). La culture des anaérobies stricts présente quelques difficultés liées à la nécessité de priver absolument d'air le milieu nutritif, elle exige l'emploi de récipients spéciaux que nous devons étudier; les milieux nutritifs que l'on utilise sont ceux qui conviennent aux aérobies.

Nous devons d'abord apprendre à priver d'air les milieux de culture et les vases qui les contiennent.

PROCÉDÉS POUR PRIVER D'AIR LES MILIEUX DE CULTURE.

A. — ÉBULLITION.

L'ébullition chasse les gaz en dissolution dans les liquides; pour priver d'air un milieu de culture, il faut prolonger l'ébullition pendant vingt minutes à une demi-heure, puis refroidir rapidement en préservant le milieu du contact de l'air atmosphérique.

B. — DÉPLACEMENT DE L'AIR PAR UN GAZ INERTE.

On peut débarrasser un liquide de l'air qu'il tient en dissolution en y faisant barboter un courant d'un gaz inerte; l'hydrogène, l'acide carbonique, l'azote, le gaz d'éclairage ont été recommandés pour cet usage.

a. **Hydrogène.** — C'est le gaz dont l'emploi doit être préféré : il se prépare facilement et n'exerce aucune action nocive sur les microbes.

On obtient facilement de l'hydrogène avec un appareil à dégagement continu construit ainsi que l'indique la figure 63.

Le flacon A contient de l'acide sulfurique pur dilué à 1/8; le fond du flacon B est garni d'une couche de fragments de tubes de verre sur laquelle on dispose des rognures de zinc. Il suffit d'élever le niveau du flacon A et d'ouvrir le robinet R pour obtenir un dégage-

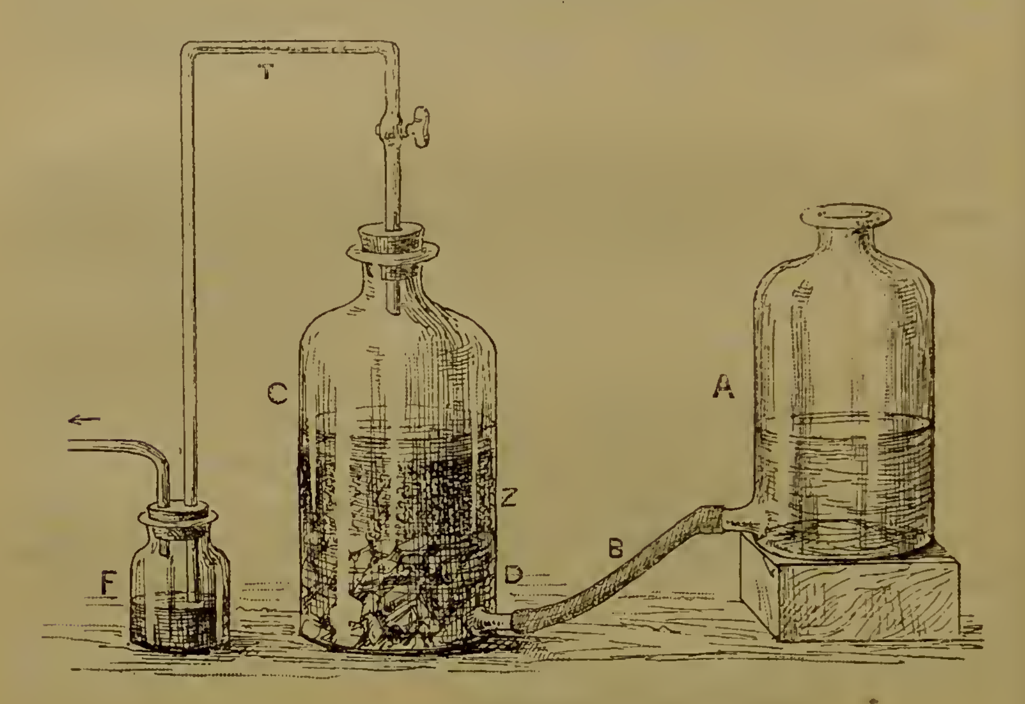


Fig. 63. — Appareil à dégagement continu d'hydrogène.

ment d'hydrogène par le tube T; veut-on arrêter l'opération, on ferme le robinet R et place les deux flacons sur le même plan. Le gaz, à la sortie de l'appareil, doit barboter dans ce flacon laveur contenant la solution suivante :

Solution de potasse à 50 p. 100..............	50 centimètres cubes.
Acide pyrogallique..........................	1 gramme.

Les impuretés, et particulièrement l'oxygène, sont ainsi arrêtées.

Avant d'utiliser le courant d'hydrogène il faut s'assurer, au moyen de la solution d'indigo blanc, qu'il n'entraîne aucune trace d'oxygène (Voy. p. 99).

b. **Acide carbonique.** — Ce gaz jouit de propriétés nocives vis-à-vis d'un grand nombre de microbes; son emploi est peu recommandable. On le préparerait à l'aide de l'appareil que nous venons de décrire, en remplaçant le zinc par des fragments de marbre blanc

et l'acide sulfurique par de l'acide chlorhydrique. On ne peut pas faire barboter l'acide carbonique dans la solution de pyrogallate de potasse, il faut la remplacer dans le flacon laveur par une solution d'hydrosulfite de soude (Voy. p. 99).

c. **Azote.** — Les difficultés de préparation de l'azote doivent faire rejeter l'usage de ce gaz dans la technique microbiologique.

d. **Gaz d'éclairage.** — L'emploi de ce gaz est facilité par cette circonstance que l'on a constamment du gaz d'éclairage sous la main dans un laboratoire. Mais beaucoup des composants qui entrent dans le mélange complexe qu'est le gaz d'éclairage jouissent de propriétés nocives vis-à-vis des microbes; l'usage d'un tel produit ne saurait donc être recommandable.

Remarque. — Toutes les fois que l'on fait barboter un gaz inerte dans un milieu de culture, il faut avoir soin de filtrer le gaz sur un tampon de coton stérilisé pour retenir les germes entraînés par le gaz; nous reviendrons plus tard sur les dispositifs à employer pour réaliser cette condition.

C. — ABSORPTION DE L'OXYGÈNE PAR L'ACIDE PYROGALLIQUE.

Pour priver un milieu d'oxygène on peut mettre à profit l'affinité que certains corps possèdent pour ce gaz. D'ordinaire on dispose le tube à culture dans un tube plus grand (ayant de 20 à 25 centimètres de hauteur) sur un petit support en verre ou en métal (Voy. fig. 73). On place dans le fond du tube extérieur, une solution alcaline d'acide pyrogallique :

Acide pyrogallique	1 gramme.
Potasse à l'alcool	1 —
Eau	10 centimètres cubes.

On ferme hermétiquement le tube extérieur avec un bon bouchon de caoutchouc; l'oxygène diffuse à travers le tampon d'ouate du tube à culture et est absorbé par la solution pyrogallique qui prend une teinte brune.

D. — ABSORPTION DE L'OXYGÈNE PAR UNE CULTURE AÉROBIE.

En ensemençant à la surface d'une culture anaérobie en milieu solide un microbe avide d'oxygène, on soustrait cette culture au contact du gaz et le développement anaérobie peut avoir lieu sous la couche protectrice fournie par le germe aérobie (Roux). Nous décrirons en détail ce procédé à propos des cultures en piqûre.

E. — EMPLOI DES MACHINES A VIDE.

L'emploi des machines à faire le vide simplifie et rend plus rigoureux les procédés de culture des anaérobies. Deux appareils à vide sont d'un usage journalier dans les laboratoires, ce sont la pompe à mercure et la trompe à eau. On joint d'ordinaire à l'emploi de ces instruments la pratique du *lavage* par un gaz inerte; on arrive ainsi à chasser toute trace d'air des récipients de culture.

Le procédé du lavage par un gaz inerte est basé sur ce fait physique que les gaz entre lesquels il n'y a pas d'action chimique se mélangent rapidement dès qu'ils sont en contact et que leur mélange est uniforme et persistant; ce mélange étant d'ailleurs d'autant plus rapide que la différence des densités des gaz composants est plus grande.

En pratique, en effet, il est impossible d'obtenir dans un récipient le vide absolu (loi de décroissance de la force élastique; influence de l'espace nuisible, influence des rentrées d'air); dans un vase préalablement rempli d'air et dans lequel on a ensuite pratiqué le vide, il reste donc toujours une faible quantité d'oxygène; on arrive à se débarrasser de ce gaz par le lavage : le résidu R, entièrement constitué par de l'air, lors de la première opération, sera composé alors que le récipient aura été rempli d'hydrogène, puis vidé de nouveau, par un mélange d'hydrogène et d'air; et répétant le lavage plusieurs fois, la quantité d'air restant dans le résidu deviendra inappréciable.

Exemple : Dans un récipient de 2 litres, il reste, le vide étant fait, 1 centimètre cube d'air supposé ramené à la pression atmosphérique. Remplissons le récipient d'hydrogène, l'air se trouvera dilué à $\frac{1}{2000}$; le vide fait alors à 1 centimètre cube près laissera dans le récipient $\frac{1}{2000}$ centimètre cube d'air et $\frac{1999}{2000}$ d'hydrogène; après le second lavage la quantité restant ne serait plus que de $\frac{1}{4\,000\,000}$ de centimètre cube.

a. **Pompe à mercure.** — Cet appareil permet d'obtenir un vide presque parfait, mais il a l'inconvénient d'être coûteux, fragile, et d'un maniement délicat et lent. On ne l'emploie guère que dans les recherches très précises et pour des récipients de petites dimensions.

Sans insister sur la manœuvre de la pompe à mercure, nous rappellerons les points capitaux suivants :

1° Avoir soin de s'assurer avant chaque opération que l'appareil fonctionne bien, que les robinets ne perdent pas; graisser légèrement ceux-ci au besoin.

2° Relier le récipient à culture à la branche horizontale H de la

pompe; faire le vide jusqu'à ce que la différence entre les niveaux du mercure dans les deux branches du manomètre soit inappréciable.

3° A ce moment, la branche verticale V étant reliée à l'appareil à hydrogène, ouvrir doucement le robinet R qui la commande, laisser l'hydrogène pénétrer lentement dans le récipient jusqu'à ce que le mercure du manomètre soit revenu à sa position première.

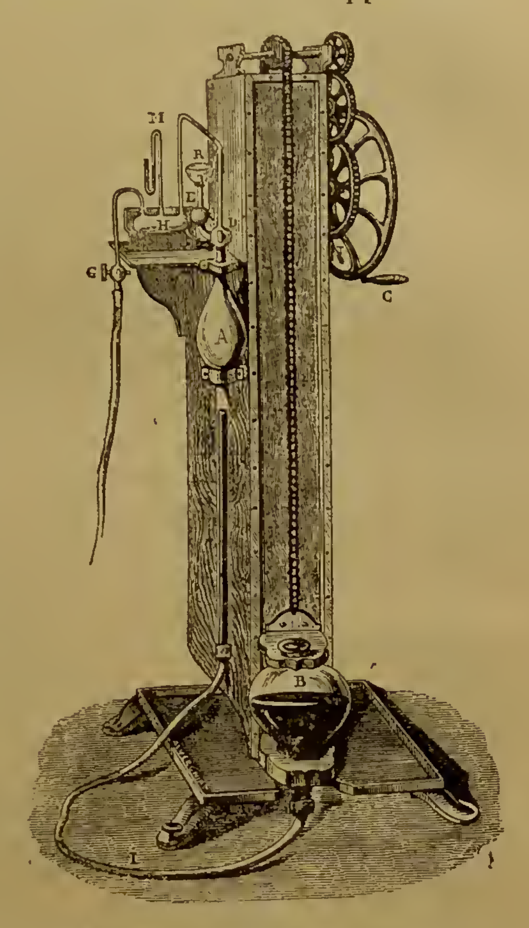


Fig. 64. — Pompe à mercure.

Intercepter alors la communication entre la pompe et l'appareil à hydrogène (robinet R). — Faire de nouveau le vide. — Recommencer deux ou trois fois l'opération. Sceller à la lampe, sous le vide, l'orifice de l'appareil à culture.

b. **Trompe à eau.** — En raison de la modicité de son prix et de la simplicité de son fonctionnement, cet appareil est le plus habituellement utilisé. Il ne donne qu'un vide approximatif et nécessite l'emploi du lavage. La trompe, métallique de préférence (modèle d'Alvergniat), doit être munie d'une rampe en cuivre portant un

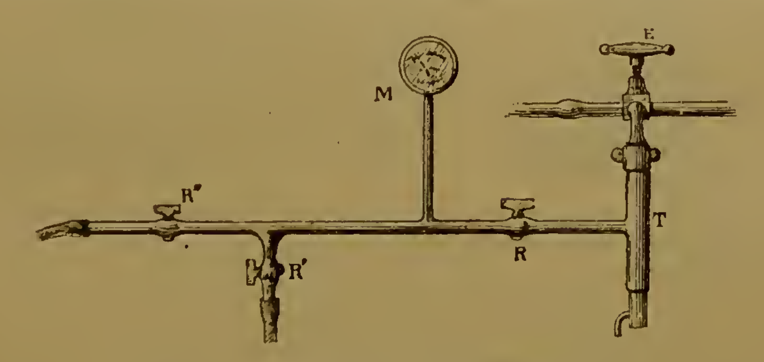


Fig. 65. — Disposition d'une trompe à eau.

manomètre et se divisant en T ainsi que l'indique la figure 65.

Le fonctionnement de la trompe exige une pression d'eau d'environ deux atmosphères. Pour faire le vide :

1° Ouvrir le robinet de la conduite d'eau, le robinet R étant fermé.

2° Le récipient à culture étant relié à la branche R′ de la rampe (1), et l'appareil à hydrogène à la branche R′, le robinet R′ étant fermé, ouvrir progressivement *r*. On suit la marche de l'opération sur le manomètre. Le robinet R″ reste ouvert pendant toute la durée de l'opération.

3° Quand le vide a été poussé aussi loin que possible, fermer R et ouvrir R′ progressivement : l'hydrogène pénètre dans le récipient.

4° Le manomètre étant retombé au zéro, fermer R′, ouvrir de nouveau R, le vide se produit une seconde fois dans l'appareil.

5° Après avoir pratiqué ainsi deux à trois lavages successifs on scelle au chalumeau, sous le vide, le col du récipient.

En pratique, on peut quelquefois se dispenser des lavages par l'hydrogène ; dans ces cas on aide au déplacement de l'oxygène contenu dans le récipient en portant le liquide à l'ébullition, ce qu'on obtient facilement, en élevant très légèrement la température (30c à 35c), soit en saisissant le vase de culture à pleine main, soit par immersion dans de l'eau tiède ou encore en léchant les parois du récipient avec une petite flamme.



Fig. 66. — Flacon de sûreté pour la trompe à eau.

Quand on se sert de la trompe à eau, toutes les fois que l'on interrompt une opération on doit fermer le robinet R qui supprime la communication entre la trompe et le récipient, avant de suspendre le cours de l'eau dans la trompe. Si l'on ne prenait cette précaution, le vide existant dans l'appareil provoquerait l'irruption brusque de l'eau dans le récipient.

Cette irruption de l'eau dans le récipient privé d'air se produirait encore si, pour une cause quelconque, la pression venait à baisser subitement dans la conduite d'eau pendant l'opération ; aussi, doit-on toujours interposer entre la trompe et le récipient à culture un flacon de 2 à 3 litres de capacité, disposé comme l'indique la figure ci-contre. Si une projection se produit, l'eau est arrêtée dans ce flacon et ne souille pas la culture.

(1) Par un tube de caoutchouc à parois épaisses, dit tube à vide.

RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE.

On a fréquemment besoin de s'assurer qu'un gaz (l'hydrogène employé pour les lavages, par exemple) ne contient pas d'oxygène. On utilise pour cela la propriété que présente l'indigo blanc de se colorer en bleu sous l'influence de petites quantités d'oxygène.

Pour préparer l'indigo blanc, on traite l'indigotine (indigo pur) par l'acide sulfurique concentré; la solution neutralisée par du carbonate de soude donne le sulfo-indigotate de soude qui, en présence d'un excès d'alcali, est facilement décoloré par les agents réducteurs. On réduit d'ordinaire ce produit par l'hydrosulfite de soude obtenu en versant sur de la poudre de zinc une solution concentrée de bisulfite de soude saturée d'anhydride sulfureux. L'hydrosulfite de soude est un réducteur énergique; il fixe l'oxygène de l'air en se transformant en bisulfite et décolore l'indigo bleu.

On s'assure qu'un gaz ne contient pas d'oxygène en le faisant barboter, à l'abri de l'air, dans la solution d'indigo blanc.

Quand on veut s'assurer qu'un milieu de culture ne renferme plus d'oxygène libre, on peut y ajouter quelques gouttes d'une solution à 2/1000 de sulfo-indigotate de soude, jusqu'à obtention d'une coloration bleue très nette, puis 1/100 en poids d'une solution normale de soude et 1/100 de glucose. Dès que l'on a extrait tout l'oxygène du milieu, la coloration bleue disparaît, le glucose réduisant l'indigo dans ces conditions.

De même si l'on ajoute simplement à un milieu de culture quelques gouttes de la solution de sulfo-indigotate de soude, puis qu'on le prive d'air et qu'on y ensemence un microbe anaérobie, la coloration bleue se détruira à mesure du développement de la culture, la décoloration commençant par les points en contact immédiat avec la culture : le microbe emprunte l'oxygène combiné, qui lui est nécessaire, aux corps qui l'avoisinent et joue le rôle de réducteur.

DISPOSITION DES CULTURES ANAÉROBIES

A. — MILIEUX LIQUIDES.

A. **Procédé de Pasteur.** — Ce procédé, utilisé par Pasteur dans ses recherches sur les fermentations, est abandonné aujourd'hui; c'est le plus ancien des procédés de culture des anaérobies, et à ce titre il mérite d'être décrit.

On remplit exactement avec le bouillon nutritif un grand ballon

semblable à celui représenté ci-dessous et portant deux tubulures; la tubulure recourbée B plonge dans une capsule de porcelaine aux trois quarts pleine du même liquide. Le robinet R étant fermé, on porte à l'ébullition pendant une demi-heure simultanément le ballon et la capsule. L'air dissout est ainsi chassé; on laisse refroidir l'appareil en place et après refroidissement on transporte l'extrémité du tube recourbé dans un vase plein de mercure. On remplit l'entonnoir E d'acide carbonique, puis on y fait passer, à l'abri de l'air, le liquide à ensemencer. On ouvre alors le robinet R placé au bas de l'entonnoir et on laisse écouler la semence dans le ballon en ayant soin qu'il reste un peu de liquide dans l'entonnoir, ce qui met à l'abri de toute chance d'accès de l'air dans le ballon. On porte alors à l'étuve.

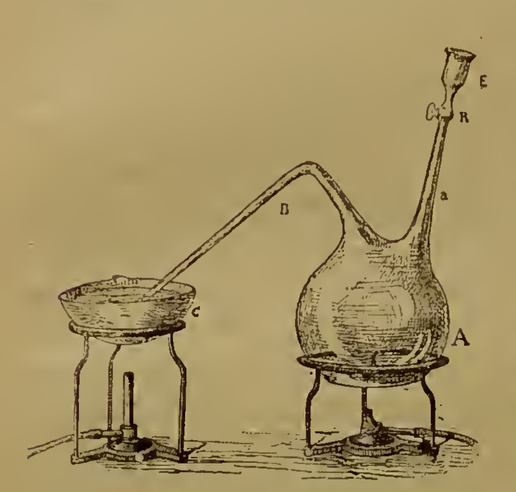


Fig. 67. — Appareil de Pasteur pour la culture des anaérobies.

B. **Procédé du tube à essai.** — 1° Prendre un tube à essai ordinaire et en étirer l'extrémité supérieure dans la flamme du chalumeau.

2° Remplir le tube de bouillon; le stériliser ouvert, et à la sortie de l'autoclave en sceller la pointe au chalumeau. Porter le tube ainsi fermé à 35° pendant quelques jours pour faire disparaître les traces d'air qui ont pu y rester.

3° Au moment de pratiquer l'ensemencement, flamber et briser l'extrême pointe, introduire dans le tube un fil de platine chargé de semence et refermer immédiatement au chalumeau.

C. **Pipette de Roux.** — **Procédé recommandé.** — 1° Prendre une pipette Pasteur stérilisée, l'étrangler sur la petite flamme du chalumeau, immédiatement au-dessous du tampon d'ouate (*a*, fig. 68).

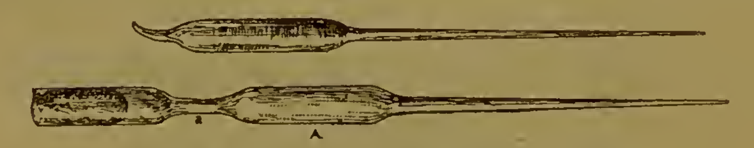


Fig. 68. — Préparation de la pipette de Roux.

2° Flamber et casser la pointe de la pipette; plonger l'extrémité ouverte dans un tube de bouillon ensemencé avec le microbe à cultiver; aspirer le liquide dans la pipette de façon à emplir celle-ci aux trois quarts.

3° En inclinant la pipette de façon à élever la pointe, fermer celle-ci sur une petite flamme.

4° Relier l'extrémité supérieure de la pipette à la machine à vide. — Pratiquer le vide et plusieurs lavages à l'hydrogène.

Il suffira souvent, le vide étant fait, de provoquer l'ébullition du liquide comme nous l'avons dit page 98. Dès que l'on chauffe la pipette, même très légèrement, le liquide bout violemment et tend à passer dans le tube d'aspiration ; on évitera la production de ce phénomène en commençant par chauffer la partie supérieure de la pipette au-dessus du niveau du liquide.

5° Le vide étant fait, sceller la pipette à la flamme au niveau de l'étranglement *a*. — Recouvrir les pointes du tube obtenu avec un peu de cire Golaz pour augmenter leur résistance. Porter à l'étuve.

6° La culture terminée, pour la retirer du tube, flamber et briser avec une pince l'une des extrémités de celui-ci, *a*, et aspirer le liquide dans une pipette Pasteur.

D. **Tube de Pasteur, Joubert et Chamberland.** — Cet appareil permet de faire deux cultures successives en pratiquant le réensemencement à l'abri du contact de l'air. Il est constitué, comme l'indique la figure 69, par un tube en U renversé dont chaque branche porte une tubulure effilée ; de la convexité de l'U part une troisième tubulure où est disposé un tampon d'ouate entre deux étranglements.

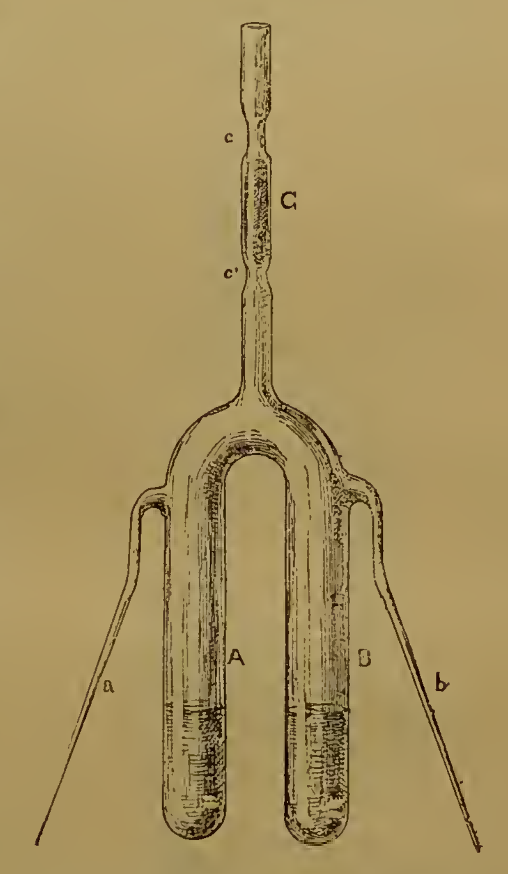


Fig. 69. — Tube de Pasteur, Joubert et Chamberland pour la culture des anaérobies.

1° Stériliser le tube au four Pasteur, les deux effilures *a* et *b* ayant été préalablement scellées dans la flamme.

2° Après refroidissement du tube, flamber l'effilure *a*, en casser la pointe, la plonger dans le bouillon ensemencé, aspirer par C de manière à faire pénétrer le liquide dans la branche A. Fermer de nouveau l'effilure *a* au chalumeau.

3° Flamber l'effilure *b*, en casser la pointe, la plonger dans un tube de bouillon stérile, aspirer comme précédemment ce bouillon dans la branche B. Fermer la pointe de *b* au chalumeau.

Dans les deux temps, 2 et 3, il faut veiller avec soin à ce que les liquides des deux branches ne se mélangent pas ; chaque branche ne doit être emplie qu'au tiers.

4° Relier la tubulure C à la machine à vide ; priver d'air l'appareil, pratiquer deux ou trois lavages à l'hydrogène; sceller dans le vide au niveau de l'étranglement *c*.

5° Porter le tube à l'étuve en le maintenant bien vertical ; la culture se produit dans la branche A, le bouillon de la branche B reste clair et sert de témoin.

6° Quand la culture est terminée en A, en inclinant l'appareil, faire pénétrer dans la branche B quelques gouttes du contenu de A, placer de nouveau à l'étuve et le bouillon B se trouble à son tour.

E. **Tube de Pasteur.** — Ce tube n'est qu'une simplification du précédent, ainsi que le montre la figure 70; il est constitué par une seule branche du tube en U que nous avons décrit tout à l'heure.

Comme pour le tube précédent, stériliser, aspirer le bouillon ensemencé par l'effilure *a*, fermer l'effilure, faire le vide par B, sceller en *b*, porter à l'étuve.

F. **Procédé du ballon à long col.** — Ce procédé est utilisé quand on se propose d'obtenir de grandes quantités de culture.

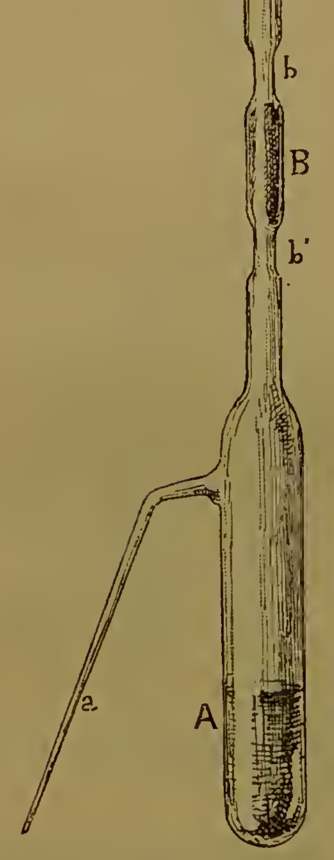


Fig. 70. — Tube de Pasteur pour la culture des anaérobies.

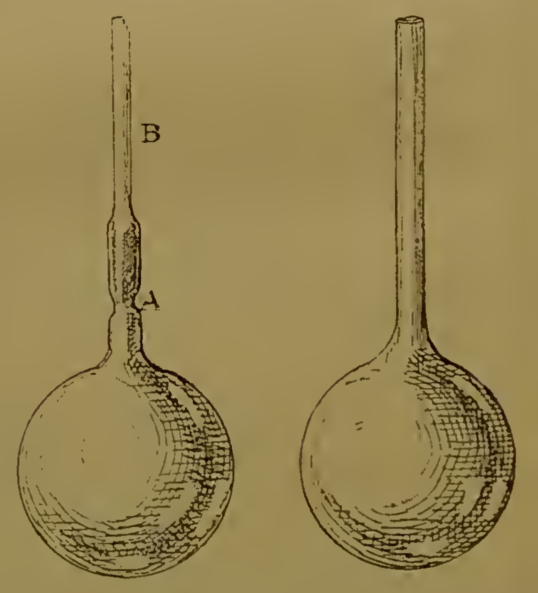


Fig. 71. — Disposition pour la culture des anaérobies dans les ballons à long col.

1° Un ballon à long col, rempli au tiers de bouillon, est bouché à l'ouate et stérilisé à l'autoclave (fig. 71).

2° Le ballon étant refroidi, enlever purement le tampon d'ouate et ensemencer le bouillon à l'aide d'une pipette à longue effilure. Le bouchon d'ouate est remis en place et repoussé jusqu'à la partie moyenne du col.

3° Étrangler légèrement le col au-dessous du tampon d'ouate, en A, puis étirer l'extrémité supérieure du tube B.

4° Relier le col effilé, B, à la trompe à eau; faire le vide et pratiquer des lavages à l'hydrogène; sceller le col au chalumeau, sous le vide. Porter à l'étuve.

5° Pour retirer la culture du ballon, couper le col, par le procédé déjà décrit, au niveau du bouchon d'ouate; enlever purement le bouchon et aspirer la culture dans une pipette ou un matras répartiteur stérilisés.

G. **Procédé du flacon. — Procédé recommandé.** — Ce procédé, qui permet, comme le précédent, d'opérer sur de grandes quantités de bouillon, a l'avantage de rendre très aisés les prélèvements de culture.

1° Choisir un flacon de un à deux litres de capacité et dont le col admette un bouchon de caoutchouc à deux trous de moyen calibre. Le flacon sera rempli aux deux tiers de bouillon (fig. 72).

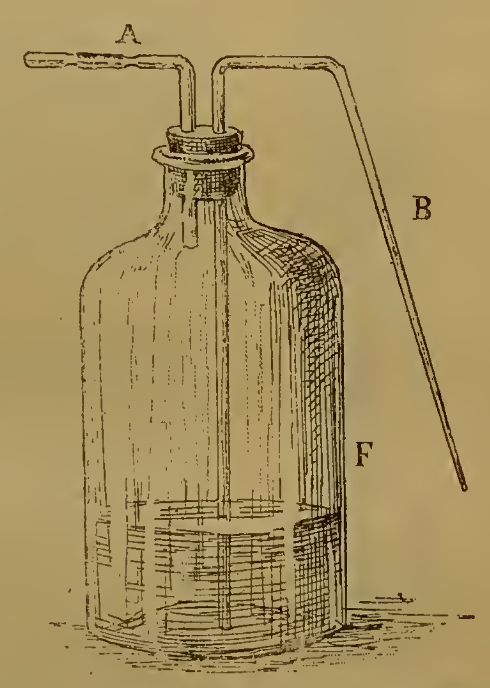


Fig. 72. — Disposition pour la manutention des filtrats.

2° Dans un des trous du bouchon, engager un tube de verre, A, recourbé à angle droit, dont une branche plonge de quelques centimètres dans le flacon et dont l'autre, extérieure, soit munie d'un tampon de coton entre deux étranglements.

L'autre trou reçoit un tube B recourbé à angle aigu dont une branche plonge jusqu'au fond du flacon et dont l'autre, extérieure, se termine par une effilure solide, fermée au chalumeau.

3° Le bouchon étant bien assujetti, l'appareil est stérilisé à 115° pendant vingt minutes. Avoir soin de chauffer lentement pour ne pas s'exposer à briser le flacon.

4° L'appareil refroidi, bien assurer le bouchon, recouvrir les joints du flacon et du bouchon et ceux du bouchon et des tubes avec de la cire Golaz; dessécher le tampon d'ouate du tube A en chauf-

fant légèrement le tube à son niveau avec une flamme de gaz.

5° Pour pratiquer l'ensemencement, flamber, puis briser avec une pince la pointe de l'effilure B; plonger l'orifice dans le tube contenant la semence, aspirer par A pour faire pénétrer quelques gouttes de semence dans le bouillon du flacon, puis refermer l'effilure B au chalumeau.

6° Relier A à la trompe à eau; faire le vide tout en immergeant les deux tiers inférieurs du flacon dans de l'eau à 35°-40°; pratiquer plusieurs lavages à l'hydrogène.

7° Sceller au chalumeau, sous le vide, l'étranglement de la branche A au-dessus du tampon d'ouate. Porter à l'étuve.

Au bout de deux à trois jours, les gaz produits par la végétation du microbe anaérobie s'accumulent dans le flacon et peuvent apporter une gêne à la continuation de la culture; il est bon de briser alors avec une forte pince l'extrémité scellée du tube A : les gaz s'échappent violemment et la culture reste protégée contre le contact de l'air par la production incessante de gaz liée au développement du microbe.

Certains microbes déterminent rapidement une acidité notable du milieu, acidité susceptible d'enrayer le développement de la culture; on y remédie en ajoutant au bouillon, avant la stérilisation, une petite quantité de carbonate de chaux ou de phosphate tricalcique: ces corps saturent les acides à mesure de leur production.



Fig. 73. — Dispositif de Buchner pour la culture des anaérobies.

Pour retirer la culture du flacon, on flambe l'effilure B, puis on en brise la pointe : il suffit de souffler par A pour déterminer l'écoulement du liquide que l'on reçoit dans un vase stérilisé.

II. **Procédé par l'acide pyrogallique** (**Buchner**). — Porter à l'ébullition, puis refroidir rapidement un tube de bouillon stérile, bouché à l'ouate. Ensemencer avec le microbe à étudier.

Disposer ce tube, comme il a été dit page 95, dans un tube de plus grandes dimensions contenant une solution concentrée de pyrogallate de potasse; boucher avec soin et porter à l'étuve (fig. 73).

Enfin, nous ne citerons que pour mémoire, sans nous attarder à les décrire, les procédés aujourd'hui inutilisés de Cochin, Nencki, Rosenbach, Hüfner, Wurtz et Foureur, etc.

B. — MILIEUX SOLIDES.

I. — ENSEMENCEMENTS PAR PIQURE.

A. **Procédé du tube à essai. — Procédé recommandé.** — a. *Gélatine.* — 1° Prendre un tube de gélatine stérilisée et porter la gélatine à l'ébullition en procédant avec précaution pour éviter la production de mousse et les projections ; maintenir l'ébullition pendant plusieurs minutes.

Avant l'ébullition, on peut ajouter à la gélatine quelques gouttes de la solution de sulfo-indigotate de soude : le microbe, en se développant, provoquera la décoloration du milieu.

2° Refroidir rapidement la gélatine ; quand elle est devenue solide, l'ensemencer par piqûre avec le fil de platine fin.

L'öse entraînant toujours un peu d'air avec elle, il est recommandable de remplacer l'öse ordinaire par le dispositif suivant : on monte le fil de platine sur la paroi d'un tube de verre relié par un tuyau de caoutchouc au générateur d'hydrogène (fig. 74). Pour l'usage, on flambe le fil de platine, on prélève la semence, puis on ouvre le robinet de l'appareil à hydrogène et on pratique l'ensemencement dans un courant de ce gaz. On se met ainsi à l'abri de toute pénétration d'oxygène.

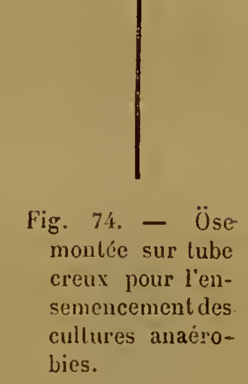


Fig. 74. — Öse montée sur tube creux pour l'ensemencement des cultures anaérobies.

3° L'ensemencement pratiqué, le tube de gélatine est immédiatement plongé dans de l'eau très froide et, avec une pipette de Pasteur, on verse à la surface de la gélatine un peu de gélose liquéfiée ; on forme ainsi au-dessus de la culture un véritable bouchon qui empêche le contact de l'air. Replacer alors le tampon d'ouate du tube.

On peut utiliser, au lieu de gélose, pour former le bouchon protecteur, de l'huile, de la vaseline liquide, etc., préalablement stérilisées.

A mesure que la culture se développe, la gélatine se fendille, se crevasse, sous l'influence des gaz dégagés.

b. *Gélose.* — Opérer comme pour la culture en gélatine.

B. **Absorption de l'oxygène par une culture aérobie (Roux).** — Opérer comme dans le procédé précédent ; dès que le bouchon de gélose est solidifié, ensemencer sa surface avec une culture de *bacillus subtilis* ; ce microbe, très aérobie, absorbe l'oxygène du tube et la culture anaérobie se développe au-dessous, à l'abri de ce gaz.

Pour faire une prise dans la culture anaérobie sans la souiller par le *bacillus subtilis*, laver extérieurement le tube au sublimé, puis le couper, par les procédés ordinaires, au niveau de la partie médiane de la culture ; la partie inférieure du tube étant détachée, on peut y puiser purement le microbe anaérobie.

C. **Pipette de Roux.** — 1° Préparer une pipette de Roux comme il a été dit page 100.

2° Flamber et casser la pointe de la pipette, la plonger dans de la gélatine stérile et qu'on vient de porter à l'ébullition. Aspirer la gélatine dans la pipette jusqu'à l'étranglement *a*. Sceller au chalumeau l'effilure et l'étranglement *a*. Plonger le tube obtenu dans de l'eau froide pour le refroidir rapidement.

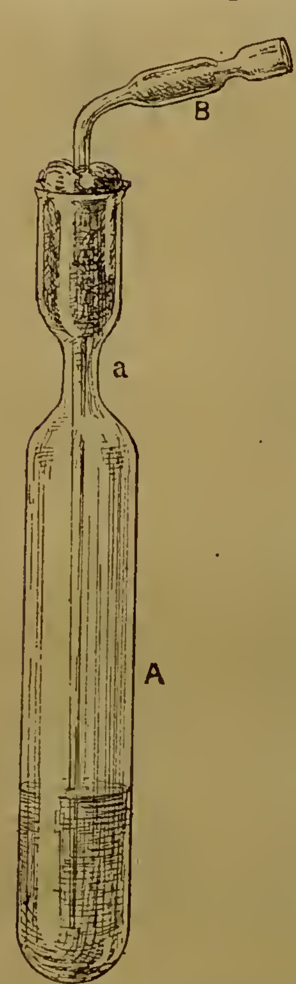


Fig. 75. — Dispositif de Roux pour la culture des anaérobies en gélatine.

3° La solidification de la gélatine étant complète, flamber rapidement la pointe *a*, en casser l'extrémité avec une pince et, par l'orifice, ensemencer par piqûre avec un fil de platine fin; refermer l'effilure au chalumeau.

4° Pour ouvrir le tube, la culture étant terminée, il faut commencer par casser la pointe inférieure au-dessus d'un verre flambé. Si l'on ouvrait d'abord le tube à sa partie supérieure, par suite de la pression des gaz dégagés par la culture, la gélatine pourrait être projetée à la face de l'opérateur.

D. **Procédé par l'hydrogène** (**Roux**). — 1° Un tube à essai contenant de la gélatine stérilisée et bouché à l'ouate est étranglé au-dessous du bouchon de manière à pouvoir être facilement fermé au chalumeau (*a*, fig. 75).

2° Relier, par un tube de caoutchouc, au générateur d'hydrogène, une pipette Pasteur stérilisée, B, qui a été coudée à angle droit au-dessous du tampon d'ouate et dont la pointe effilée doit pouvoir pénétrer très aisément dans l'étranglement du tube de gélatine.

3° La gélatine étant liquéfiée au bain-marie, flamber et briser l'extrémité effilée de la pipette, puis plonger cette effilure dans la gélatine en l'insinuant entre la paroi du tube et le tampon d'ouate.

4° Faire barboter pendant plusieurs minutes l'hydrogène, puis soulever le tube effilé au-dessus du niveau de la gélatine qu'on rend

solide par un refroidissement rapide; le courant d'hydrogène continue à passer au-dessus de la gélatine et empêche l'introduction de l'air.

5° Soulever alors le tampon d'ouate, pratiquer l'ensemencement par piqûre avec un fil de platine fin, le courant d'hydrogène passant toujours.

6° L'ensemencement terminé, retirer le tube à hydrogène et sceller rapidement au chalumeau au niveau de l'étranglement *a*.

II. — ENSEMENCEMENTS EN STRIE.

a). *Gélatine et gélose.*

Tube de Roux. — Le tube de Roux pour culture en strie est un tube à essai étiré à sa partie supérieure A et portant une tubulure latérale B (fig. 76).

1° Avec un entonnoir à tige effilée, verser de la gélatine nutritive au fond du tube; fermer *a* à la lampe; munir B d'un tampon d'ouate compris entre deux étranglements.

2° Stériliser à l'autoclave le tube ainsi préparé.

3° Au moment du besoin, liquéfier la gélatine à basse température, relier B à la trompe à eau, faire le vide et pratiquer des lavages à l'hydrogène (la gélatine est maintenue liquide pendant ces opérations).

4° Le tube étant privé d'air et rempli d'hydrogène, le coucher de manière que la gélatine se solidifie en surface inclinée.

5° La solidification obtenue, flamber et briser l'extrémité de la tubulure *a*; par cette tubulure, pratiquer avec un fil de platine l'ensemencement en strie, puis sceller de nouveau *a*. Pendant cette opération, la tubulure B reste en communication avec le générateur d'hydrogène; ce gaz s'échappe par *a* et empêche l'air de pénétrer dans le tube.

6° Il ne reste plus alors qu'à sceller la tubulure B au niveau de l'étranglement *b* : la culture se produit alors dans une atmosphère d'hydrogène; on pourrait aussi faire de nouveau le vide dans l'appareil avant de sceller en *b*.

b). *Pomme de terre.*

Tube de Roux. — 1° Au tube ordinaire pour les cultures sur pomme de terre, souder, au-dessous de l'étranglement, un tube latéral, B, dans lequel on place un tampon d'ouate (fig. 77). On trouve dans le commerce des tubes ainsi préparés.

Introduire un morceau de pomme de terre dans le tube et stériliser comme d'ordinaire (page 52).

2° La pomme de terre étant refroidie et égouttée, l'ensemencer

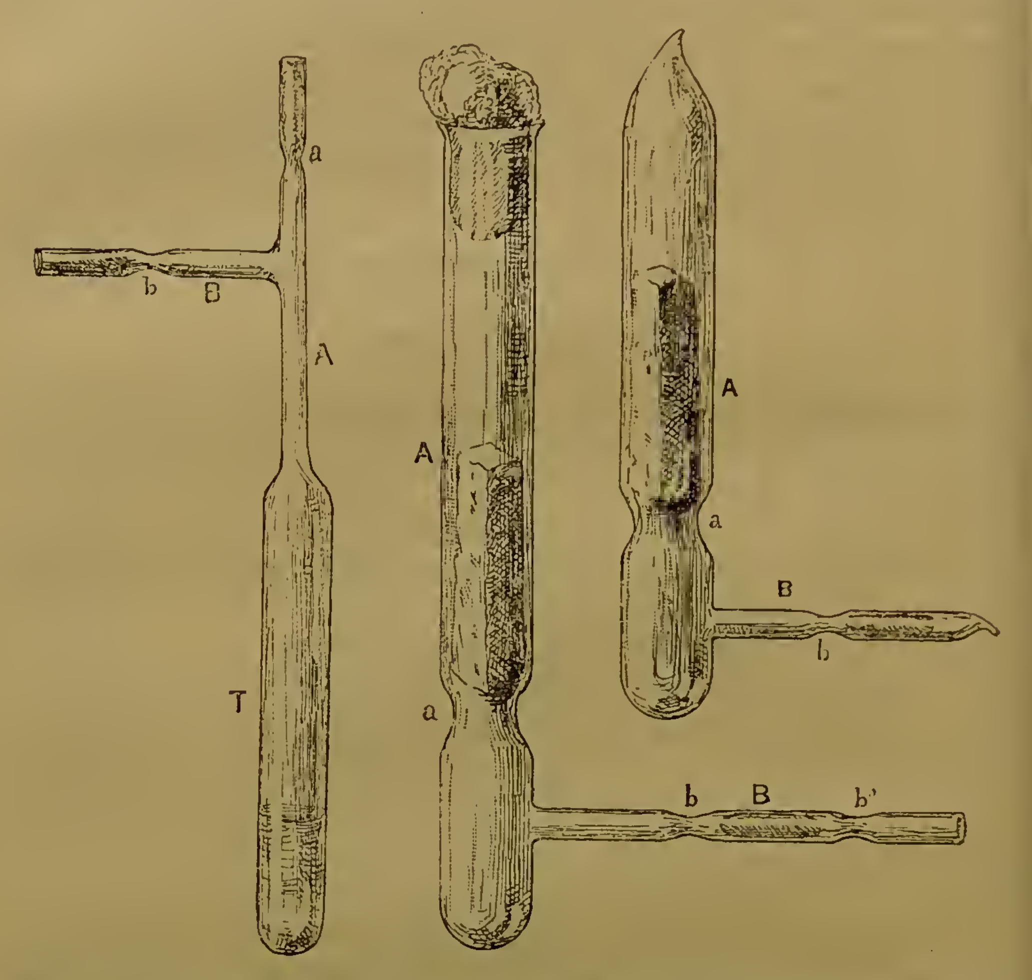


Fig. 76. — Tube de Roux pour ensemencement en strie.

Fig. 77. — Tube de Roux pour les cultures anaérobies sur pomme de terre.

selon le procédé habituel, puis fermer à la lampe l'extrémité supérieure du tube, au-dessous du tampon d'ouate (fig. 77, partie gauche).

3° Relier à la trompe la tubulure B, faire le vide, laver à l'hydrogène.

4° Sceller au chalumeau, sous le vide, la tubulure B au niveau de son étranglement *b* et porter l'appareil à l'étuve.

III. — ISOLEMENT DES ANAÉROBIES.

A. **Procédé des plaques.** — Ce procédé est laborieux, et donne difficilement de bons résultats; il permet par contre d'obtenir des

plaques semblables à celles que l'on prépare avec les microbes anaérobies et que l'on peut facilement porter sous le microscope.

1° Ensemencer avec le microbe à étudier trois tubes de gélatine stérilisée et liquéfiée et préparer trois plaques comme il a été dit pour la séparation des aérobies (page 85);

2° Tenir préparée d'avance la cloche à dessécher dans le vide (après lavage au sublimé) et placer dans son récipient à acide sulfurique une solution de pyrogallate de potasse préparée comme nous l'avons dit plus haut;

3° A mesure de leur confection, disposer les plaques sur l'étagère, à l'intérieur de la cloche;

4° Luter la cloche avec soin, y faire le vide, pratiquer plusieurs lavages à l'hydrogène; isoler enfin la cloche en fermant le robinet qui la relie à la trompe.

B. **Boîte de Kitasato.** — C'est une boîte de verre, plate et circulaire, des dimensions d'une boîte de Petri et portant deux tubulures



Fig. 78. — Boîte de Kitasato.

latérales A et B. La tubulure B est effilée et fermée à la lampe; A est bouchée par un tampon de coton.

1° Stériliser la boite au four Pasteur;

2° Flamber et casser la pointe de l'effilure B, la plonger dans un tube de gélatine ensemencée et aspirer par A de manière à faire pénétrer la gélatine dans la boîte. Sceller de nouveau B et laisser solidifier la gélatine;

3° Relier A à la trompe, faire le vide comme d'ordinaire, laver à l'hydrogène, sceller au niveau de l'étranglement *a*.

Ce procédé est excellent, mais il exige la mise en œuvre d'un appareil coûteux et fragile.

C. **Tube d'Esmark modifié par Fraenkel.** — 1° Prendre trois tubes à essai à parois minces, de 3 à 4 centimètres de diamètre et sans rebord saillant à l'orifice; chaque tube reçoit une petite quantité de gélatine, est bouché à l'ouate puis stérilisé à l'autoclave;

2° Préparer pour chaque tube à essai un bouchon de caoutchouc à deux trous portant deux tubes de verre coudés à angle droit à l'extérieur et dont l'un plonge jusqu'au fond du tube à essai, tandis que

l'autre s'arrête au-dessous du bouchon ; la partie extérieure de chaque tube porte un tampon d'ouate maintenu entre deux étranglements (fig. 79).

Envelopper chaque bouchon muni de ses deux tubes dans plusieurs doubles de papier filtre et stériliser à l'autoclave ;

3° La gélatine étant liquéfiée à basse température, ensemencer les

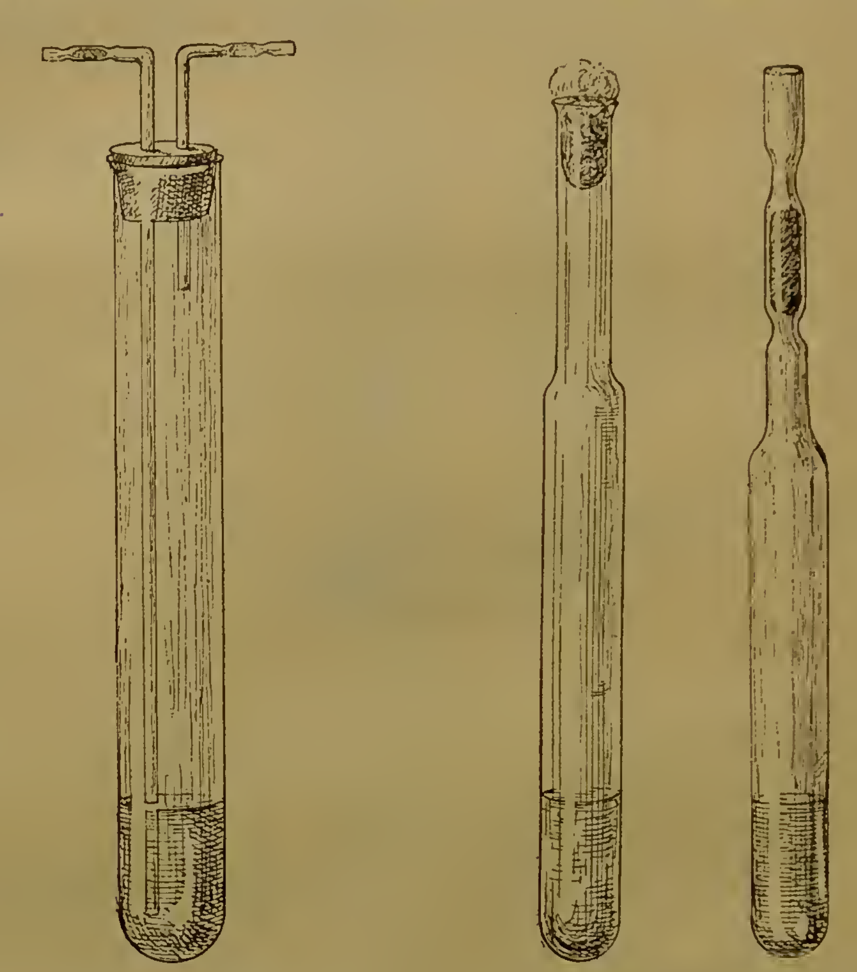


Fig. 79. — Tube de Fraenkel pour culture anaérobie en plaque roulée.

Fig. 80. — Préparation du tube de Roux pour culture anaérobie en plaque roulée.

trois tubes par la méthode des dilutions, comme nous l'avons dit page 83 ;

4° Remplacer rapidement le tampon d'ouate de chaque tube par un bouchon de caoutchouc, sorti du papier au moment même de l'employer, en ayant soin de ne pas toucher les parties qui pénétreront dans le tube à essai. Bien fixer le bouchon et le recouvrir de cire Golaz ;

5° Relier le tube le plus long, *a*, à l'appareil à hydrogène et faire barboter le gaz dans la gélatine (maintenue liquide par immersion

dans l'eau à 35°-40°) pendant cinq à dix minutes; fermer alors au chalumeau les effilures *a* et *b*;

6° Porter le tube sous un robinet d'eau froide et faire solidifier la gélatine sur les parois du tube en plaque enroulée d'Esmark (Voy. p. 87).

D. **Tube d'Esmark modifié par Roux. — Procédé recommandé.** — 1° Prendre un tube à essai de 3 centimètres de diamètre environ et terminé par un tube plus étroit (fig. 80). Y verser avec un entonnoir à tige effilée quelques centimètres cubes de gélatine; fermer l'orifice du tube étroit avec un tampon d'ouate; stériliser à l'autoclave; laisser refroidir;

2° Liquéfier la gélatine à basse température, enlever le tampon d'ouate, ensemencer avec l'öse de platine (ensemencer plusieurs tubes par le procédé des dilutions successives), replacer le tampon, le repousser dans le tube et étrangler celui-ci, au-dessus et au-dessous, en *a* et en *b*;

3° Relier le tube effilé à la trompe à eau; faire le vide; laver à l'hydrogène; sceller au-dessus de l'ouate, le tube étant rempli d'hydrogène;

4° Porter sous un robinet d'eau froide et enrouler la gélatine.

Pour examiner les colonies développées, il suffira de couper le tube circulairement à sa partie supérieure et de faire pénétrer un fil de platine par l'ouverture.

E. **Tube à hydrogène.** — Cet appareil permet de se passer de la machine à vide; il est constitué par un tube de verre long de 25 cen-



Fig. 81. — Tube de Roux pour culture en plaque dans l'hydrogène.

timètres environ, ayant 3 à 4 centimètres de diamètre et portant à chacune de ses extrémités un tube, *a* et *b*, de petit diamètre, recourbé à angle droit et bouché par un tampon d'ouate (fig. 81).

1° Stériliser l'appareil au four à flamber;

2° Enlever le tampon d'ouate de la branche *a*, et par cette branche introduire avec une pipette Pasteur de grandes dimensions la gélatine ensemencée en quantité suffisante pour remplir la moitié inférieure du tube A;

3° Étrangler les deux tubes *a* et *b* au-dessus du tampon d'ouate;

plonger le tube A dans un vase plein d'eau à 35°-40° pour maintenir la gélatine liquide ;

4° Relier *a* au générateur d'hydrogène ; le gaz circule dans le tube, barbote dans la gélatine et sort par *b* ; au bout de quelques minutes, laisser refroidir la gélatine, le gaz continuant à passer, et sceller au niveau des étranglements des tubes *a* et *b*.

On peut encore utiliser un tube analogue à celui de la figure 82; le maniement est le même que pour le précédent.

E. **Tube de Vignal. — Procédé recommandé. —** 1° Prendre un tube de verre de

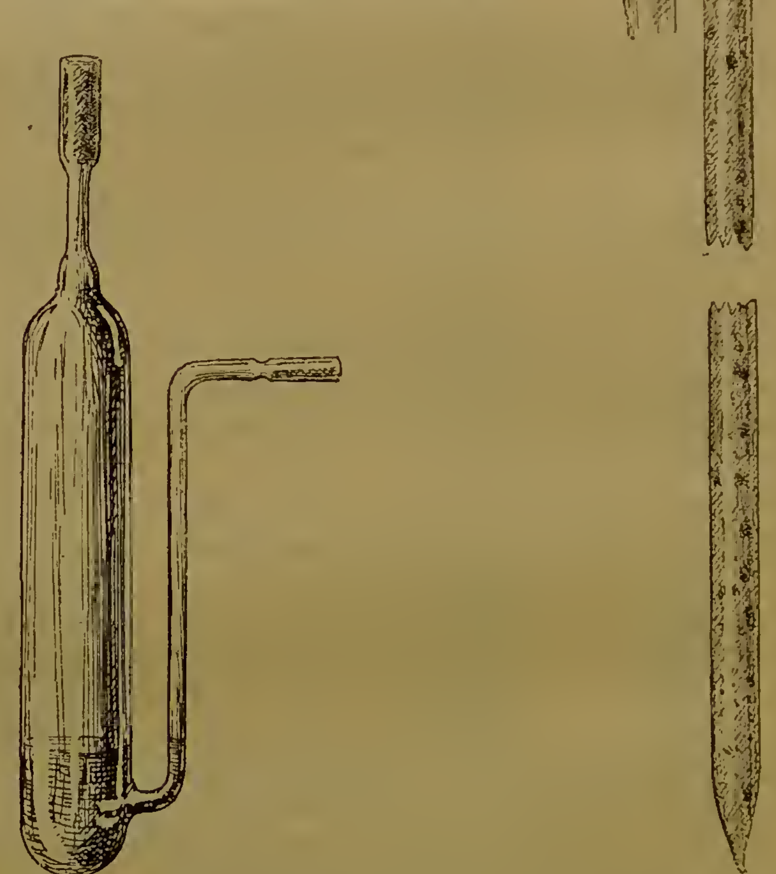


Fig. 82. — Tube pour la culture en plaque dans l'hydrogène. Fig. 83. — Tube de Vignal.

faible diamètre (3 à 4 millimètres) et d'un mètre de long ; en effiler une extrémité, boucher l'autre avec un tampon d'ouate et faire un étranglement à 3 ou 4 centimètres au-dessous (A, fig. 83, partie droite).

Stériliser le tube ainsi préparé en le chauffant fortement dans la flamme ;

2° Porter à l'ébullition (après coloration facultative par le sulfo-

indigotate de soude), un tube de gélatine stérilisée; le laisser refroidir sous un courant d'hydrogène selon le procédé exposé page 106; avant solidification complète, ensemencer en continuant à laisser passer le courant de gaz inerte; mélanger en communiquant au tube un mouvement rapide de rotation entre les deux mains;

3° Flamber et casser la pointe effilée du tube de Vignal; plonger cette pointe dans la gélatine et aspirer par la partie supérieure de façon à remplir le tube jusqu'à l'étranglement A. Agir avec précaution pour ne laisser pénétrer aucune bulle de gaz dans le tube; sceller au chalumeau l'effilure, puis l'étranglement A.

Les colonies se développent bientôt, disséminées dans la gélatine; pour effectuer le prélèvement, flamber légèrement le tube ou le laver au sublimé puis à l'alcool au niveau de la colonie à étudier; le couper à ce niveau et prélever avec l'öse de platine.

CHAPITRE VII

LE MICROSCOPE ET SES ACCESSOIRES

Les recherches bactériologiques exigent l'emploi d'un bon microscope, capable de fournir des grossissements de 600 à 1000 diamètres ; on a rarement l'occasion d'utiliser des grossissements plus considérables.

Le statif du microscope doit être lourd et stable, muni d'une crémaillère pour les mouvements rapides et d'une vis micrométrique pour les mouvements lents. Le tube portera un revolver pour deux ou trois objectifs ; la platine en ébonite doit être large ; il est souvent avantageux de posséder une platine tournante et pouvant être centrée. Le pied doit être muni d'une charnière permettant d'incliner le corps du microscope et d'un appareil d'éclairage possédant un miroir, plan d'un côté, concave de l'autre, et pouvant recevoir un condensateur Abbé. Les diaphragmes seront du type *cylindrique* ou *iris* à l'exclusion du disque tournant.

La partie optique du microscope est celle dont le choix présente le plus de difficultés.

Pour les recherches courantes, il suffira de posséder deux oculaires (I ou II et III), et quatre objectifs, 2, 6, 8 ou 9 à sec, et 1/12 à immersion homogène. Dans certains cas on utilise encore l'objectif 1/18 à immersion homogène. Ces numéros s'appliquent aux instruments français et à ceux provenant de chez Reichert, à Vienne, et Leitz, à Wetzlar ; les objectifs de Zeiss correspondants sont AA, DD, E, à sec et 1/12 à immersion homogène. Les préparations reproduites dans cet ouvrage ont été dessinées à la chambre claire sous un microscope Reichert.

Il faudra posséder en outre une chambre claire, un micromètre objectif et un oculaire micrométrique.

I. — CHOIX DES OBJECTIFS.

Avant d'acquérir un objectif, il faut s'assurer qu'il remplit certaines conditions que nous allons passer en revue.

A. — GROSSISSEMENT.

Par grossissement d'un système optique, il faut entendre le grossissement en diamètres. Les fabricants de microscopes livrent avec leurs appareils une table indiquant les grossissements réalisés par les diverses combinaisons d'objectifs et d'oculaires. On vérifiera, à

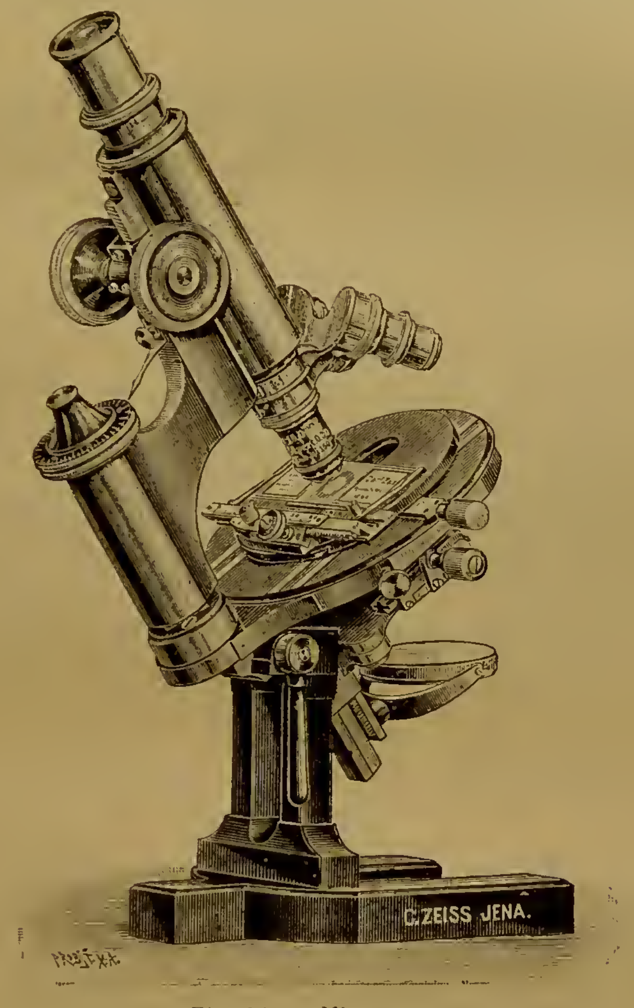


Fig. 84. — Microscope.

l'aide d'un des deux procédés suivants, les indications fournies par cette table.

Tout d'abord il faut savoir que le grossissement varie avec la distance séparant l'objectif de l'oculaire ; il faut donc toujours opérer avec une même longueur de tube ; les microscopes ordinairement employés possèdent un tube à tirage sur lequel est gravée une échelle divisée en millimètres : il est de règle de donner au tube une longueur de 160 millimètres, ce que l'on obtient en sortant le tube à tirage jusqu'à ce que la division 160 affleure la douille du tube fixe.

a. **Méthode de la chambre claire.** — Cette méthode exige l'emploi de la chambre claire et du micromètre objectif, lame de verre mince sur laquelle ont été tracées avec la machine à diviser des stries parallèles également espacées de 1/100 de millimètre. On opère de la façon suivante :

1° Le microscope étant muni du système optique dont on veut mesurer le grossissement, le tube étant tiré à 160 millimètres, placer sur la platine le micromètre objectif et mettre au point : on aperçoit alors nettement les divisions du micromètre ;

2° Disposer au niveau et sur le côté droit de la platine une planchette couverte d'un papier, bleuâtre de préférence ; placer sur l'oculaire la chambre claire ;

3° En regardant alors dans le microscope on perçoit deux images du micromètre : l'une est fournie directement par les rayons traversant la chambre claire sans réfraction, l'autre est projetée par le prisme sur le papier. Si l'on approche la pointe d'un crayon de l'image des divisions sur le papier, l'œil perçoit aussi la pointe du crayon ; il est aisé dès lors de fixer sur le papier, d'un trait de crayon, la position de quelques-unes de ces divisions ;

4° Cela fait, on mesure directement, à l'aide d'une règle divisée en millimètres, la distance qui sépare deux des divisions tracées sur le papier ; soit n le nombre de millimètres obtenus, sachant que chaque division du micromètre mesure 1/100 de millimètre, et en appelant G le grossissement du système optique, on a :

$$\frac{1}{100} \times G = n.$$

D'où

$$G = n \times 100.$$

Si par exemple l'intervalle entre deux divisions mesure 5 millimètres, on obtiendra :

$$G = 5 \times 100 = 500.$$

Ce qu'on exprime en disant que le grossissement est de 500, ou plus exactement de 500 diamètres.

On pourra encore à l'aide de la chambre claire projeter directement les divisions grossies du micromètre sur une règle divisée en millimètres et placée au niveau de la platine du microscope, on noterait alors le nombre n des divisions de la règle recouvertes par m divisions micrométriques, et l'on appliquerait la formule :

$$G = 100 \frac{n}{m}.$$

Si, par exemple, 3 divisions du micromètre correspondent à 15 divisions de la règle, on a :

$$G = 100 \times \frac{15}{3} = 500.$$

La méthode que nous venons d'exposer est très rapide, mais a l'inconvénient de ne donner que des résultats approximatifs ; les évaluations qu'elle fournit sont toujours un peu supérieures à la réalité.

b. **Méthode de l'oculaire micrométrique.** — L'oculaire micrométrique est constitué par une lame de verre où sont tracés des traits parallèles distants l'un de l'autre de 1/10 de millimètre et qui est placée dans un oculaire entre la lentille de champ et la lentille frontale.

On connaît d'avance le grossissement de l'oculaire (10, d'ordinaire) ; chaque division de l'échelle vue à travers l'oculaire vaut dès lors 1/10 de millimètre $\times$ 10 = 1 millimètre.

1° Placer sur la platine du microscope le micromètre objectif ; mettre en place l'oculaire micrométrique et l'objectif à étudier, tirer le tube à 160 millimètres. Mettre au point et faire coïncider, en déplaçant le micromètre objectif, ses divisions avec celles de l'oculaire ;

2° Constater combien une division du micromètre objectif couvre de divisions de l'oculaire ; en représentant par n ce dernier nombre on a :

$$\frac{1}{100} \times G = n.$$

D'où

$$G = n \times 100.$$

Si, par exemple, 5 divisions de l'oculaire sont couvertes par une de l'objectif, on obtient :

$$G = 5 \times 100 = 500.$$

B. — CORRECTION DE L'ABERRATION DE RÉFRANGIBILITÉ.

Pour éviter la décomposition de la lumière blanche par les lentilles de l'objectif, chacune de celles-ci est composée de deux verres, l'un plan concave, l'autre convexe. La lentille convergente est en *crown*, qui disperse peu ; la divergente en *flint* qui disperse beaucoup ; en donnant à ces deux lentilles une épaisseur convenable, on corrige l'aberration (lentilles achromatiques). L'achromaticité, toutefois, n'est jamais complète ; aussi voit-on les objets étudiés au microscope, tantôt avec des contours bleuâtres (correction par excès, la plus ordinaire), tantôt avec des contours jaunâtres (correction par défaut). Il faut s'assurer en choisissant un objectif que l'aberration en est minime.

C. — POUVOIR RÉSOLVANT.

Le pouvoir résolvant d'un objectif permet de voir la plus grande quantité possible de stries fines; il est très important que les objectifs utilisés en bactériologie possèdent ce pouvoir à un haut degré.

Le pouvoir résolvant est en rapport direct avec l'*angle d'ouverture* de l'objectif. L'angle d'ouverture est l'angle formé par les deux rayons extrêmes qui, partant d'un même point de l'objet à examiner, peuvent arriver à l'œil de l'observateur. Plus cet angle est grand, plus est considérable la quantité de rayons lumineux qui arrivent d'un même point à l'œil observateur, et par conséquent mieux est définie la situation des différents points qui composent l'objet.

Il y a un grand intérêt à donner aux objectifs, particulièrement pour les forts grossissements, un angle d'ouverture aussi grand que possible ; on arrive aujourd'hui à construire des objectifs possédant des angles d'ouverture de 140° à 180°.

Pratiquement, on caractérise les objectifs moins par leur angle d'ouverture que par leur *ouverture numérique*, c'est-à-dire la propriété de recevoir le plus grand nombre de rayons émanés du même point, ou, en un mot, la mesure de l'intensité lumineuse de l'objectif. Le pouvoir résolvant augmente avec l'ouverture numérique. Les bons objectifs portent, gravée sur le manchon, l'indication de leur ouverture numérique ; on peut déterminer cette ouverture numérique a, en appliquant la formule :

$$a = n \text{ sinus } \frac{1}{2} i$$

n, représentant l'angle d'ouverture, se mesure à l'aide d'un instrument spécial, l'*apertomètre*, sur le maniement duquel nous ne pouvons insister ici.

Le *pouvoir définissant* d'un objectif est la propriété de montrer nettement les contours des objets examinés ; il est fonction des corrections des aberrations de sphéricité (emploi des diaphragmes) et de réfrangibilité (emploi des objectifs achromatiques).

En pratique, on évalue les pouvoirs résolvant et définissant d'un objectif à l'aide des *test-objets* constitués par des préparations de diatomées. Un bon objectif doit montrer clairement les stries fines et nettement les contours des diatomées examinées.

Ces diatomées sont d'ordinaire : *Pleurosigma angulatum*, *Grammatophora subtilissima*, *Navicula crassinervis*, *Surdrella gemina*, etc. ; avec *Pleurosigma angulatum*, le plus fréquemment employé, on doit

voir, pour un grossissement de 500-600 diamètres et une ouverture numérique de 1,20 à 1,25, une nervure centrale à laquelle viennent aboutir de part et d'autre deux systèmes de lignes obliques se coupant à angle aigu et déterminant de petits polygones réguliers ; un bon objectif donne une image très nette à contours bien distincts.

Il est bon aussi d'examiner avec l'objectif à l'épreuve des préparations de microbes de petites dimensions, tels que le bacille tuberculeux ; on se rendra ainsi compte du grossissement et de la netteté de l'objectif.

D. — CLARTÉ.

La clarté dépend et de la correction des aberrations et de l'ouverture numérique ; un bon objectif doit être clair, le champ doit être large, blanc, et uniformément éclairé.

E. — LONGUEUR DU FOYER.

L'angle d'ouverture ne peut être considérable que si l'objectif a un très court foyer; les objectifs forts ont nécessairement une distance focale assez courte (2 millimètres environ pour les objectifs 9 et 1/12) ; mais un objectif ne doit jamais avoir besoin de toucher le couvre-objet pour être au point, à plus forte raison faudrait-il rejeter tout objectif dont le foyer serait trop court pour que l'on puisse observer les objets recouverts avec un couvre-objet ordinaire.

II. — SOINS A DONNER AU MICROSCOPE.

Le microscope doit être conservé à une température moyenne, loin de toute source de chaleur et à l'abri des rayons directs du soleil : une élévation de température trop considérable ferait fondre le baume de Canada qui relie les diverses parties des lentilles et mettrait les objectifs hors d'usage. Il faut également protéger l'instrument contre les poussières. Le mieux est de placer le microscope sur la table de travail sur un morceau de feutre épais et de le recouvrir avec une cloche de verre.

La première condition de toute observation est d'opérer avec des lentilles excessivement propres : la lentille de l'objectif, celles de l'oculaire devront toujours être essuyées avec un linge fin avant de servir à un examen.

Quand on aperçoit des grains de poussières dans le champ du microscope, on recherchera l'endroit où ils se trouvent de la façon suivante : on fait tourner l'oculaire sur lui-même dans le tube ; si les

grains de poussière sont sur les lentilles de l'oculaire, ils se déplacent avec celui-ci ; s'ils restent immobiles,ils sont situés sur l'objectif.

On examinera les lentilles à quelque distance de l'œil, contre la lumière; on verra ainsi facilement si elles sont couvertes de buée, si des grains de poussière y adhèrent, etc.

On nettoie la lentille de l'objectif en la frottant légèrement par un mouvement circulaire avec un linge très propre et très fin ; si ce nettoyage est insuffisant, on prend un morceau de moelle de sureau, on le casse de façon à obtenir une surface de section fraîche, on applique le centre de cette surface contre la lentille et on communique à l'objectif un mouvement de rotation en l'appuyant légèrement contre la moelle.

Quand la lentille est souillée par de l'huile de cèdre, du baume de Canada, de la résine Damar, on dépose une goutte de xylol sur un linge fin et on frotte doucement la lentille avec le linge ainsi imbibé. On doit se garder de mouiller trop fortement le linge ou de verser du xylol sur l'objectif : le réactif, pénétrant entre la monture et la lentille, pourrait dissoudre le baume qui relie les verres de l'objectif et mettre l'instrument hors d'état de servir.

Quand on examine les préparations dans des réactifs chimiques (potasse caustique, acides, etc.), il faut éviter que ces réactifs ne viennent au contact des lentilles; si cet accident se produisait, laver de suite l'objectif à l'eau distillée et le sécher avec un linge fin.

Si, pour une raison ou une autre, l'objectif se trouble et que le nettoyage de la lentille extérieure ne suffise pas à lui rendre sa clarté, il ne faut pas essayer de dévisser pour nettoyer les lentilles intérieures, mais l'envoyer au constructeur qui seul peut le rétablir dans son état primitif.

Il faut éviter soigneusement d'exposer les objectifs à des chocs ou à des chutes, aussi légers qu'ils puissent être.

Le nettoyage de l'oculaire et du condensateur Abbé se fera de la même façon que celui de l'objectif, mais ici les lentilles sont beaucoup plus abordables et infiniment moins délicates ; on nettoiera de même les miroirs d'éclairage.

Après chaque examen, avant de replacer le microscope sous la cloche, les oculaires et objectifs utilisés seront essuyés avec soin, l'objectif à immersion, particulièrement, sera débarrassé de toute trace d'huile de cèdre.

Le statif sera fréquemment essuyé et débarrassé de toute trace de poussière à l'aide d'une peau de chamois ; on frottera toujours dans le sens suivant lequel le vernis a été appliqué. Éviter de souiller le statif avec le baume, l'huile de cèdre ; dans le cas où

cet accident se produirait, frotter très légèrement avec un linge très légèrement imbibé de xylol et immédiatement après essuyer avec la peau de chamois; ne jamais mettre un excès de xylol et ne pas prolonger le contact du réactif; sans quoi on enlèverait le vernis qui recouvre le métal.

La platine en ébonite se nettoye à l'aide d'un linge imbibé de xylol.

De temps en temps on doit lubréfier les vis et les charnières avec un peu de vaseline.

III. — MANIEMENT DU MICROSCOPE.

Pour pratiquer les observations, il faut placer le microscope sur une table massive, près d'une fenêtre; on prendra la lumière sur un ciel clair ou sur un mur blanc, mais on n'utilisera jamais directement les rayons solaires.

A défaut de lumière naturelle, on peut employer l'éclairage artificiel obtenu au moyen d'une bonne lampe à pétrole à courant d'air ou mieux d'une lampe à albo-carbone; dans ce cas, il sera souvent nécessaire d'interposer entre la source de lumière et le microscope une lame en verre dépoli pour rendre l'éclairage moins intense.

A. — ÉCLAIRAGE.

Tourner le microscope du côté de la source de lumière, saisir le miroir par ses parties latérales et l'incliner dans les différentes directions jusqu'à ce qu'on projette par le trou de la platine une lumière suffisante pour que l'œil placé sur l'oculaire voit le champ du microscope bien éclairé.

1° Quand on se sert des objectifs à sec, utiliser le miroir concave qui projette un faisceau de rayons qui viennent converger au point où est placé l'objet à examiner;

2° Quand on utilise l'objectif à immersion, il faut placer sous la platine le *condensateur Abbé*; cet appareil, composé de plusieurs lentilles, transforme en un faisceau convergent, dont le foyer se trouve au niveau de l'objet, les rayons parallèles que lui envoie un miroir plan; il permet d'obtenir un éclairage considérable. *Quand on emploie le condensateur, il faut toujours utiliser le miroir plan.*

Toujours placer un diaphragme sous la platine; le choix de l'ouverture du diaphragme dépend du grossissement que l'on utilise : plus l'objectif est puissant, plus l'ouverture du diaphragme doit être petite. Le diaphragme corrige l'aberration de sphéricité et rend les

images plus nettes en retenant les rayons marginaux, inutiles ou nuisibles.

B. — DISPOSITION DE L'OBJET.

L'objet à examiner est placé sur une lame de verre mince, très transparente et sans bulles, dite porte-objet; il est recouvert par une lamelle de verre dite couvre-objet, de forme carrée, de 18 à 25 millimètres de côté et dont l'épaisseur ne dépasse pas $0^{mm},15$ à $0^{mm},20$.

L'épaisseur du couvre-objet a une grande influence sur les observations microscopiques. Les rayons lumineux émanant de l'objet subissent en traversant le couvre-objet une déviation plus ou moins grande selon l'épaisseur de cette lamelle.

Comme le montre la ligne ci-jointe, étant donné un point A de l'objet, l'image, par suite de la déviation, ne sera pas rapportée uniquement à ce point, mais se fera sur toute la ligne DE; par suite, elle sera diffuse; avec les forts grossissements surtout, la clarté et la netteté de l'image seront considérablement diminuées.

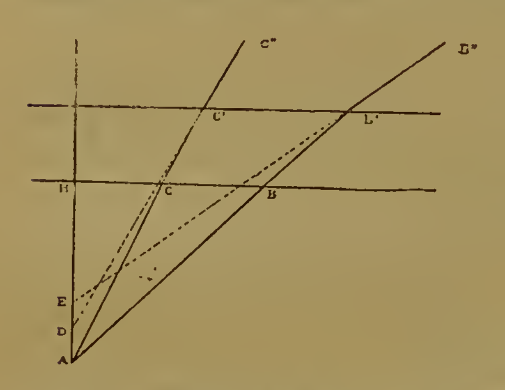


Fig. 85. — Déviation des rayons lumineux par leur passage à travers la lamelle couvre-objet.

Pour remédier à cet inconvénient, il faudrait n'employer que des lamelles d'une épaisseur donnée, pour laquelle seraient réglés les objectifs; en pratique on ne peut obtenir des lamelles toujours identiques et on préfère munir les objectifs d'une certaine puissance d'une *correction* qui permet de modifier la distance entre les lentilles composant l'objectif: plus la lamelle est épaisse, plus il faut rapprocher les lentilles, ce qui, d'autre part, diminue la distance focale et augmente le grossissement.

L'importance de la correction est d'ailleurs moins grande aujourd'hui, car tous les microscopes possèdent un tube de tirage : par l'influence qu'exerce la longueur du tube, on peut corriger, dans de certaines limites, l'influence de l'épaisseur de la lamelle. Le tube doit être rentré d'autant plus que la lamelle est plus épaisse; le tube étant complètement rentré, on pourra encore utiliser des lamelles de $0^{mm},25$ d'épaisseur, alors qu'avec la longueur normale du tube (160 millimètres), on se servirait de couvre-objets de $0^{mm},15$ à $0^{mm},20$.

C. — OBJECTIFS A IMMERSION HOMOGÈNE (1).

Les objectifs à immersion homogène n'ont pas besoin de correction ; l'immersion a pour but de s'opposer à la déviation des rayons lumineux par suite de leur passage du verre dans l'air. Ces objectifs diffèrent des objectifs à sec en ce qu'on relie leur lentille frontale à la lamelle couvre-objet au moyen d'une gouttelette d'un liquide dont l'indice de réfraction est très voisin de celui du verre (*huile de cèdre* : 1,515 à 1,520; *mélange d'huile de ricin et d'essence d'anis* : 1,510 environ ; *monobromonaphtaline* : 1,66).

Quand des rayons lumineux passent de la lamelle dans l'air, ils subissent une déviation telle que tout rayon frappant la surface du verre sous un angle supérieur à 41°,48 sort parallèlement à la surface de la lamelle et est perdu pour l'objectif : en substituant à l'air une substance de même indice que le verre on évite cette perte de rayons. L'emploi de l'immersion augmente considérablement la netteté de l'image; c'est ainsi qu'un objectif à immersion homogène dont l'angle d'ouverture mesure 82° a la même valeur (ouverture numérique) qu'un objectif à sec dont l'angle d'ouverture serait de 180°. De plus, pour un même grossissement, l'objectif à immersion a une distance focale plus grande que l'objectif à sec.

L'usage de l'objectif à immersion nécessite l'emploi du condensateur Abbé et ne donne des résultats parfaits que pour une longueur donnée du tube du microscope (160 millimètres d'ordinaire).

Pour utiliser l'objectif à immersion, on dépose sur la lamelle une goutte d'huile de cèdre épaissie, fournie par le fabricant même qui a construit l'objectif, et on abaisse celui-ci jusqu'à ce que sa lentille frontale vienne au contact de la goutte d'huile.

L'objectif à immersion ne doit être employé que pour l'étude des préparations colorées ; il n'est pas applicable à l'examen des microbes non colorés, car la quantité de rayons lumineux fournie par le condensateur noie les objets incolores et en rend les contours très vagues.

D. — REVOLVER.

Le revolver ordinairement employé est construit pour trois objectifs ; on le munit des nos 2, 8 ou 9 et 1/12 à immersion homogène ; il faut avoir soin de placer ces objectifs sur le revolver à leur véritable place, indiquée par un chiffre gravé sur la paroi de l'instru-

(1) Nous laisserons de côté les objectifs à immersion à eau, peu employés aujourd'hui.

ment; cette précaution est indispensable pour obtenir un bon centrage; le mouvement de rotation du revolver permet de faire passer selon les besoins les différents objectifs sous le tube du microscope sans avoir jamais à les dévisser.

E. — MISE AU POINT.

La mise au point comporte deux temps : 1° La recherche du foyer approximatif; 2° la recherche du foyer exact.

La *distance focale* varie avec les divers objectifs et est d'autant plus faible que le grossissement est plus fort. L'observateur doit s'habituer à connaître approximativement cette distance pour chaque objectif, de façon à effectuer rapidement le premier temps de la mise au point.

La mise au point approximative se fait à l'aide de la crémaillère pour mouvements rapides; la recherche du point exact est effectuée à l'aide de la vis micrométrique qui commande les mouvements lents.

Quand on emploie de forts grossissements, l'objectif se trouve très près du couvre-objet et un mouvement brusque imprimé de haut en bas au tube du microscope briserait infailliblement la préparation : pour éviter cet accident il faut opérer ainsi qu'il suit :

1° Avant d'appliquer l'œil sur le microscope, abaisser doucement le tube à l'aide de la crémaillère jusqu'à ce que la lentille frontale arrive au contact du couvre-objet : regarder directement la préparation pendant tout ce temps ;

2° Alors seulement placer l'œil sur l'oculaire, et en tournant la crémaillère en sens inverse, effectuer la mise au point approximative;

3° Saisir alors la vis micrométrique, et en imprimant à celle-ci de très légers mouvements, achever la mise au point.

La vis micrométrique ne doit jamais servir à effectuer des mouvements étendus; cette vis, très sensible et très délicate, agit sur le tube du microscope par l'intermédiaire d'un ressort à boudin que de grandes incursions mettraient rapidement hors d'usage.

Pendant toute la durée de l'observation le pouce et l'index de la main droite ne quitteront pas la vis micrométrique et lui imprimeront constamment de très minimes déplacements : on arrive ainsi, sans mettre en jeu l'accommodation, à juger des reliefs, à voir successivement les différents plans de l'objet examiné, et par conséquent à se rendre un compte exact de sa forme.

Quand on étudie une préparation, la main gauche ne quitte pas la lame et la fait glisser sur la platine de façon à en faire passer les

différents points sous le champ du microscope suivant les besoins de l'observation.

F. — OCULAIRES.

Dans la grande majorité des recherches, il faut employer des oculaires faibles, les oculaires forts n'augmentant le grossissement qu'aux dépens de la clarté et de la netteté de l'image; les oculaires I ou II sont d'un usage courant; on n'utilise les nos III et IV que dans certaines recherches délicates exigeant un grossissement considérable.

IV. — MENSURATION DES OBJETS MICROSCOPIQUES.

Il est d'un grand intérêt de pouvoir mesurer les dimensions des objets microscopiques; le bactériologiste est appelé à chaque instant à pratiquer cette opération.

On adopte comme unité dans les mensurations microscopiques le millième de millimètre que l'on désigne par la lettre μ. On dira, par exemple, que le bacille tuberculeux mesure 1μ, 5 à 3μ, 5 de long sur 0μ, 2 à 0μ, 4 de large.

Les mensurations microscopiques peuvent s'effectuer par deux procédés différents.

A. — EMPLOI DE LA CHAMBRE CLAIRE.

1° A l'aide du micromètre objectif et de la chambre claire on détermine le grossissement G du système optique que l'on doit utiliser (Voy. p. 116).

2° On remplace le micromètre objectif par la préparation où se trouve l'objet à mesurer, et on dessine cet objet sur un papier disposé comme pour la détermination précédente.

3° On mesure sur le papier la longueur en millimètres du diamètre du dessin obtenu; soit n cette longueur.

4° Les deux nombres G et n étant connus, on en déduit facilement le diamètre D de l'objet en appliquant la formule

$$D = \frac{n}{G}.$$

Exemple. — Le grossissement d'un système optique est de 500 diamètres, le plus grand diamètre du dessin à la chambre claire d'un bacille tuberculeux mesure 1mm,5 de longueur; on obtient en appliquant la formule

$$D = \frac{1^{mm},5}{500} = 0^{mm},003 = 3\,\mu$$

c'est-à-dire que la longueur du bacille tuberculeux est de 3 μ.

On peut à l'avance composer une table des grossissements de chacun des systèmes optiques dont on dispose ; l'opération de la mensuration se trouve ainsi simplifiée.

B. — EMPLOI DU MICROMÈTRE OCULAIRE.

1° On examine le micromètre objectif avec l'objectif dont on doit se servir pour examiner l'objet à mesurer et l'oculaire micrométrique et l'on constate que, avec l'objectif 8, par exemple, une division du micromètre objectif couvre 5 divisions de l'oculaire, ce qui revient à dire que 5 divisions de l'oculaire correspondent à un objet mesurant 1/100 de millimètre et que par conséquent 1 division de l'oculaire correspond à 1/500 de millimètre, soit à 2 μ.

2° On remplace le micromètre objectif par l'objet à mesurer et on constate que celui-ci couvre n division de l'oculaire.

3° Sachant qu'une division de l'oculaire correspond à un objet de 2 μ, et en appelant D le diamètre de l'objet, on a :

$$D = n \times 2\,\mu.$$

Si l'objectif couvre, par exemple, 2 divisions, on obtient :

$$D = 2 \times 2\,\mu = 4\,\mu.$$

On peut, à l'avance, dresser un tableau donnant la valeur en μ d'une division de l'oculaire micrométrique pour chacun des objectifs que l'on possède ; on n'a plus alors qu'à multiplier cette valeur par le nombre des divisions couvertes par l'objet.

Pour les objectifs de Reichert, par exemple, on obtient la table suivante :

Avec l'objectif	2	une division de l'oculaire	micrométrique vaut	27 μ
—	4	—	—	11 μ
—	8	—	—	2 μ,2
—	9	—	—	1 μ,9
—	$\frac{1}{12}$	—	—	1 μ,8

Application. — Soit un objet qui, avec l'objectif 8, couvre 2 divisions, on aura

$$D = 2\,\mu{,}2 \times 2 = 4\,\mu{,}4.$$

Pour un objet vu avec l'objectif à immersion 1/12 et couvrant 3 divisions, on aura de même :

$$D = 1\,\mu{,}8 \times 3 = 5\,\mu{,}4.$$

Il est aisé de comprendre qu'on arrivera à des mensurations d'autant plus exactes qu'on fera usage de grossissements plus forts : on réduit ainsi d'autant les erreurs d'observation.

V. — LAMES ET LAMELLES.

Les lames et les lamelles remplissant les conditions que nous avons exposées plus haut (page 122) doivent en outre être excessivement propres.

a. Les lamelles neuves sont légèrement grasses et ne se laissent pas mouiller par l'eau ; avant de les employer il faut les laver à l'alcool à 95ᶜ, puis les essuyer soigneusement avec un linge fin ne peluchant pas ; enfin, quand on veut obtenirune pureté parfaite, on passe plusieurs fois la lamelle dans la flamme chauffante d'un bec de Bunsen.

Pour essuyer les lamelles il faut avoir soin de ne jamais les tenir avec les deux mains ; on les briserait ainsi infailliblement. Chaque lamelle placée dans un pli du linge doit être saisie et frottée entre le pouce et l'index de la main droite.

On doit toujours avoir sur la table de travail un petit baquet de verre à couvercle contenant de l'alcool à 95ᶜ et dans lequel trempe une provision de lamelles qui seront sorties de l'alcool et essuyées au moment même du besoin.

Pour les manipulations, les lamelles sont saisies par un de leurs angles avec une *pince de Cornet* (fig. 86).

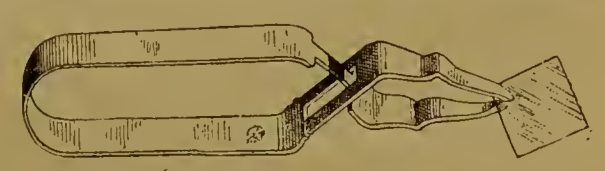


Fig. 86. — Pince de Cornet.

Les lames seront également lavées à l'alcool et essuyées soigneusement.

b. Les lames et les lamelles peuvent être utilisées plusieurs fois ; il faut avoir soin alors de les laver soigneusement pour les débarrasser complètement des produits qui y ont été déposés ; faute de ce soin on s'exposerait à de graves erreurs dans les observations ultérieures.

Ce nettoyage, d'importance capitale, devra être pratiqué ains qu'il suit :

1° Les lames et les lamelles sont recueillies après chaque manipulation dans un cristallisoir de verre plein d'alcool à brûler ; quand on en a un nombre suffisant on procède au nettoyage.

2° Retirer les lames et lamelles de l'alcool, les placer dans une capsule en porcelaine et les couvrir avec une solution de carbonate de soude à 4 p. 100.

Faire bouillir une dizaine de minutes.

3° Rejeter la solution alcaline, laver à grande eau, puis verser

dans la capsule sur les lames et lamelles une quantité suffisante de la solution suivante :

Eau	1000	grammes.
Bichromate de potasse	20	—
Acide sulfurique	100	—

Faire bouillir pendant trente minutes.

4° Rejeter la solution acide, laver à grande eau, essuyer les lames et les lamelles et les placer séparément dans deux cristallisoirs couverts pleins d'alcool à 95°, où on les prendra au fur et à mesure des besoins.

Ce procédé de nettoyage donne une sécurité entière.

CHAPITRE VIII

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROBES PRÉLEVÉS DANS UNE CULTURE

L'examen microscopique des microbes qui se sont développés dans une culture peut être pratiqué selon deux modes différents. La méthode la plus simple consiste à prélever une trace de la culture, à la porter sous le microscope et à examiner ainsi les microbes sans coloration, à l'état frais. Cette méthode permet de juger de la forme des microbes, de reconnaître s'ils sont animés de mouvements, d'étudier la modalité et la rapidité de ces mouvements, mais elle est insuffisante pour mettre en lumière certains détails de morphologie. On a alors recours aux préparations colorées qui permettent d'employer des grossissements plus considérables et font mieux ressortir les particularités de structure des bactéries.

A. — EXAMEN SANS COLORATION.

Une parcelle de la culture à examiner peut être placée simplement entre une lame et une lamelle et portée sous le microscope ; mais, quand on veut conserver les microbes vivants pendant un certain temps dans la préparation pour étudier leur mode de développement, par exemple, on pratique l'examen en utilisant des lames spéciales présentant une petite concavité ou *cellule*. Dans cette cellule on dépose une goutte de bouillon ensemencée avec le microbe et on peut ainsi obtenir une véritable culture sous le microscope même.

I. — EXAMEN SUR LAME ORDINAIRE.

A. — CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES.

1° Préparer une lame et une lamelle absolument propres.

2° Dans le tube, ouvert avec les précautions ordinaires, prélever avec une pipette Pasteur quelques gouttes de culture.

3° La lamelle étant saisie par un de ses angles avec la pince de Cornet, déposer sur le centre une petite goutte du liquide aspiré dans la pipette.

4° Poser la lamelle sur la lame de manière que la face qui porte la goutte de culture repose sur la lame; éviter dans cette opération l'introduction de bulles d'air qui gêneraient l'observation. La goutte s'étend en une couche mince entre la lamelle et la lame.

5° Porter sur la platine du microscope; examiner avec l'objectif 8 ou 9 et l'oculaire I ou II.

La pipette qui a servi à prélever la goutte de culture ne devra plus être employée; il faut avoir soin, particulièrement quand on manie des microbes pathogènes, de ne jamais déposer sur la table une pipette qui a été en contact avec une culture. Les pipettes utilisées, réunies dans un vase métallique, sont stérilisées après chaque séance de manipulations, soit à l'autoclave, soit plus simplement par une ébullition de quelques minutes; alors seulement elles peuvent être jetées.

B. — CULTURES EN MILIEUX SOLIDES.

1° Sur le centre de la lamelle tenue avec la pince de Cornet déposer une goutte d'eau récemment filtrée.

2° Ouvrir comme d'ordinaire le tube de culture; prélever une trace de la culture avec l'öse de platine; refermer le tube.

3° Porter la trace de culture dans la gouttelette d'eau, sur la lamelle, et l'y délayer avec l'extrémité de l'öse. Flamber l'öse avant de la poser sur la table.

4° et 5° Comme plus haut.

Une faute souvent commise consiste à prélever une trop grande quantité de culture : on a alors un trop grand nombre de microbes dans le champ du microscope et l'observation est rendue très difficile; bien savoir que la préparation est d'autant plus démonstrative que les microbes y sont moins nombreux; on juge alors mieux de leur forme, de leurs mouvements, etc.

II. — EXAMEN EN CELLULE.

L'usage des cellules permet de conserver longtemps la vitalité du microbe soumis à l'examen et d'étudier son développement.

Pour suivre le développement d'un microbe dans une culture en cellule, il est indispensable de placer celle-ci à la température qui convient le mieux à ce microbe (37^{c} d'ordinaire). On y arrive aisément en déposant la cellule dans une étuve d'où on la retire fréquemment pour la porter sous le microscope. On peut encore

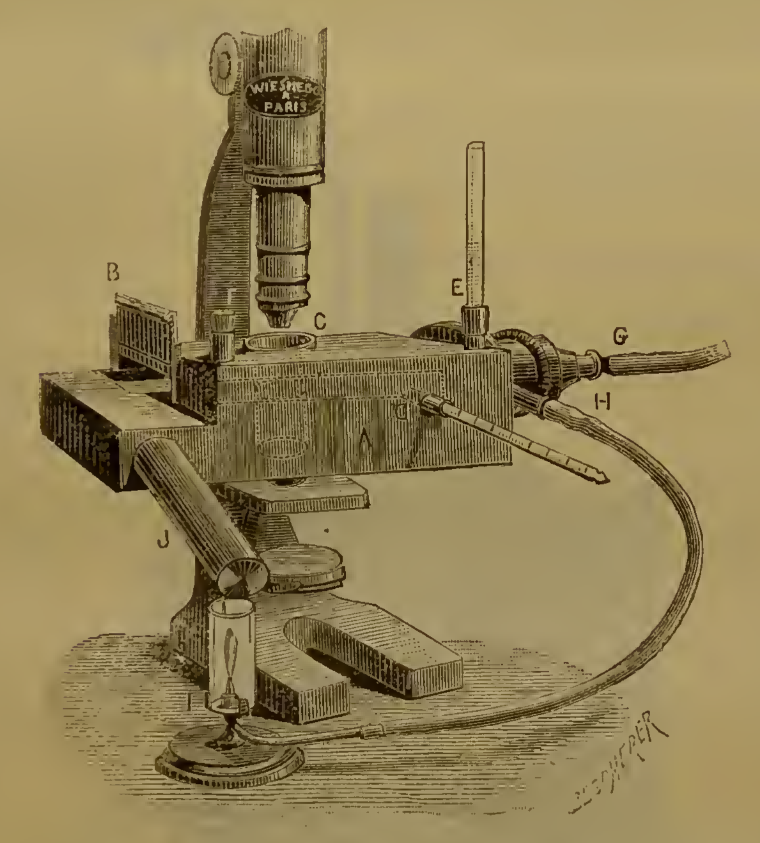


Fig. 87. — Chambre chaude de Vignal.

maintenir la cellule à la température optima sur la platine même du microscope en utilisant la *chambre chaude de Vignal* (fig. 87) ou la *platine chauffante de Ranvier*, véritables petites étuves dans lesquelles on observe la préparation par une ouverture circulaire découpée dans l'appareil ; ces chambres se placent sur la platine du microscope.

La *platine chauffante de Pfeiffer* est beaucoup plus simple et répond aux mêmes besoins ; elle est constituée par une boîte rectangulaire en verre dont la face supérieure sert de porte-objet et est creusée

d'une cellule ; la boîte remplie d'eau est reliée à un thermostat par deux tubulures latérales ; un thermomètre *t*, indique la température (fig. 88 et 89). On dispose l'appareil sous le microscope comme une lame ordinaire.

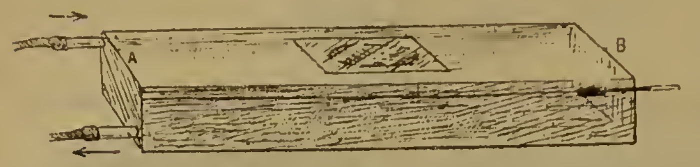


Fig. 88. — Platine chauffante de Pfeiffer.



Fig. 89. — Coupe suivant A B de la platine chauffante de Pfeiffer.

Enfin on peut pla-

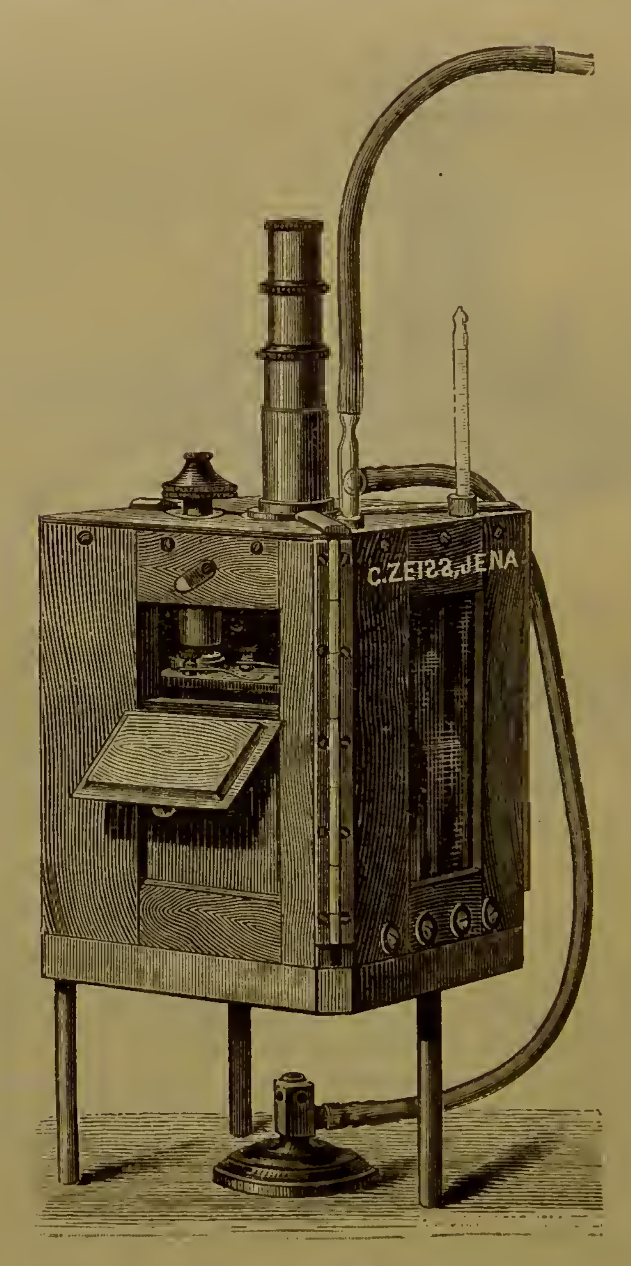


Fig. 90. — Étuve de Zeiss pour observations au microscope.

cer la partie inférieure du microscope dans une petite étuve (Zeiss) constituée par une boîte en acajou entourant le statif, munie d'une fenêtre pour laisser passer la lumière nécessaire aux observations et de clapets latéraux pour permettre de manipuler la préparation. L'appareil est chauffé au moyen d'un brûleur à gaz relié à un régulateur plongé dans l'étuve. On ne peut dépasser une température de 45° sans endommager le microscope.

On peut utiliser des cellules de plusieurs modèles.

A. — CELLULE DE KOCH.

Procédé recommandé. — La cellule de Koch est une lame porte-objet de dimensions ordinaires, mais creusée en son centre d'une dépression circulaire en cupule mesurant environ 15 millimètres de diamètre. On stérilise cette lame au moment de l'usage en la passant plusieurs fois rapidement dans la flamme du bec de Bunsen ou d'une forte lampe à alcool.

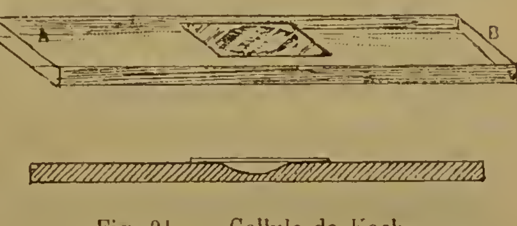


Fig. 91. — Cellule de Koch.

La lamelle destinée à couvrir la cellule est également stérilisée par flambage au moment du besoin.

La cellule peut être utilisée pour étudier les microbes dans une culture antérieurement développée. Pour cela on dépose au centre de la lamelle flambée et refroidie une gouttelette de la culture ; on retourne alors la lamelle sur la cellule : la goutte de liquide adhérant à la face inférieure de la lamelle se trouve suspendue dans l'atmosphère de la cellule. On a soin de recouvrir avec un peu de vaseline les bords de la lamelle pour empêcher l'évaporation du liquide.

Il faut que la goutte déposée au centre de la lamelle soit assez petite pour ne pas toucher les bords de la cellule, sans quoi la capillarité ferait passer le liquide entre la lamelle et la lame et la goutte suspendue disparaîtrait.

Au cours de l'examen microscopique, il faut effectuer très prudemment le mouvement d'abaissement du tube du microscope : la lamelle ne portant que par ses bords, la moindre pression suffit à la briser. Se servir de l'objectif 8 ou 9 et de l'oculaire 1 ou 11.

Mais le plus fréquemment on utilise la *goutte suspendue* pour observer le développement d'un microbe : il faut alors que la culture se fasse dans la cellule même. Pour cela on dépose sur la lamelle une goutte de bouillon stérile ou d'humeur aqueuse prélevée purement et on ensemence cette goutte avec le microbe à examiner.

Dans cette opération, il est capital que l'ensemencement n'apporte à la goutte qu'un très petit nombre de germes; on peut prélever une trace de culture à l'extrémité d'un fil de platine droit et toucher très légèrement la goutte avec ce fil, mais il est préférable de recourir à la méthode des dilutions, telle que nous l'avons indiquée (p. 83). On porte une goutte de la culture à examiner dans un tube de bouillon I, on agite; avec une ou deux gouttes du tube I, on ensemence un nouveau tube II, et c'est une goutte de bouillon prélevée dans ce tube qui sera déposée sur la lamelle. Si le tube II contenait encore trop de microbes, on ensemencerait un tube III avec quelques gouttes du tube II, et c'est dans ce tube qu'on prélèverait la goutte à examiner.

En résumé :

1° Flamber la lame et la lamelle; laisser refroidir.

2° Porter au centre de la lamelle une goutte de bouillon stérile et ensemencer avec une trace de culture (ou mieux porter sur la lamelle une goutte du milieu nutritif ensemencé préalablement par la méthode des dilutions).

3° Renverser la lamelle sur la cellule; luter les bords à la vaseline.

4° Examiner sur une platine chauffante ou porter à l'étuve et examiner d'heure en heure sur la platine ordinaire; se servir de l'objectif 8 ou 9 et de l'oculaire I ou II. S'assurer au commencement de l'épreuve que chaque champ du microscope ne contient que deux ou trois germes au plus.

L'observation peut être poursuivie pendant un, deux et même trois jours; la quantité d'air contenue dans la cellule autour de la goutte suspendue suffit d'ordinaire à assurer le développement du microbe.

B. — CELLULE IMPROVISÉE.

Découper dans une feuille de carton un rectangle d'environ 3 centimètres de long sur 2 de large et 1,5 à 2 millimètres d'épaisseur; enlever au centre un petit carré de 15 millimètres de côté; stériliser le morceau de carton par ébullition dans l'eau ou dans l'autoclave à 115°, le placer avec une pince flambée sur une lame passée à la flamme : on obtient ainsi une cellule sur laquelle on appliquera la lamelle portant la goutte pendante.

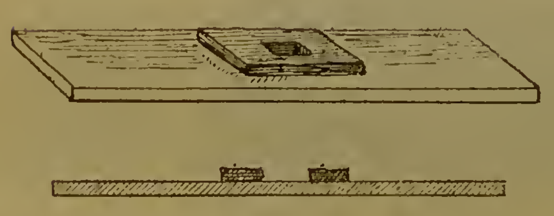


Fig. 92. — Cellule improvisée.

Mêmes usages que l'appareil précédent.

C. — CELLULE DE BŒTTCHER.

Cette cellule est constituée par une lame de verre sur laquelle est collée un petit anneau de verre de 15 à 20 millimètres de diamètre et de 5 millimètres de hauteur. Sur la cellule ainsi constituée on applique la lamelle portant la goutte suspendue. On place d'ordinaire un peu d'eau au fond de la cellule pour éviter l'évaporation de la goutte suspendue.

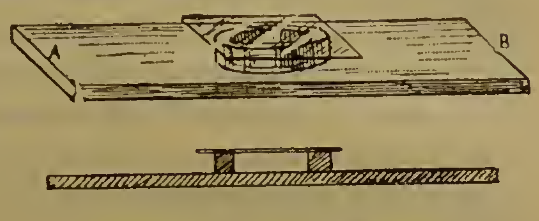


Fig. 93. — Cellule de Bœttcher.

Mêmes utilisations que les appareils précédents.

D. — CELLULE DE RANVIER.

Dans les appareils que nous venons de décrire, la goutte suspendue présente une face inférieure sphérique; il en résulte une perturbation des rayons lumineux qui traversent le système, perturbation qui apporte une certaine gêne à l'observation. Dans les recherches délicates, il est préférable que le liquide examiné présente deux faces parallèles; cette disposition est réalisée dans la cellule de Ranvier.

Cette cellule est constituée par une lame de verre un peu épaisse portant à son centre une rainure circulaire de 15 à 20 millimètres de diamètre délimitant un plateau qu'elle entoure de tous côtés, plateau dont la face supérieure est moins élevée que celle de la lame d'un dixième de millimètre. La goutte de liquide étant déposée sur ce plateau, on couvre avec la lamelle; la goutte écrasée entre la face supérieure du plateau et la face inférieure de la lamelle forme une couche d'un dixième de millimètre d'épaisseur, entourée de tous côtés par l'air retenu dans la rainure; on lute les bords de la lamelle et on opère pour le reste comme avec les appareils précédents.

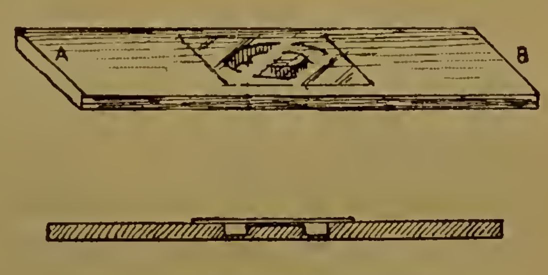


Fig. 94. — Cellule de Ranvier.

B. — EXAMEN APRÈS COLORATION.

Les méthodes de coloration permettent non seulement d'étudier la morphologie des microbes, mais fournissent en outre des données importantes pour le diagnostic des espèces.

Les différentes espèces bactériennes, en effet, ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des matières colorantes; les unes fixent facilement les couleurs et ne se laissent pas décolorer par l'alcool; d'autres au contraire abandonnent à l'alcool les matières colorantes qu'elles ont fixées; d'autres encore se colorent difficilement, mais résistent à l'action des décolorants les plus énergiques (Voy. *Bacille de la tuberculose*).

Les bactéries sont des cellules végétales où le noyau occupe la plus grande place; elles se colorent par les colorants du noyau des cellules végétales, c'est-à-dire les *couleurs basiques d'aniline.*

Matières colorantes. — Ehrlich a divisé, au point de vue de leur action sur les cellules, les matières colorantes en deux groupes : les *couleurs basiques* et les *couleurs acides*.

Les *couleurs basiques* sont celles dont le principe colorant est une base combinée à un acide incolore. On les appelle encore *couleurs à élection*, car elles ont une électivité marquée pour les noyaux et particulièrement les noyaux des cellules végétales. Ces couleurs sont les véritables colorants des microbes; les plus employées d'entre elles sont les suivantes :

Bleus	Bleu de méthylène. Bleu de quinoléine.
Violets	Krystal violet. Violet de Lauth (thionine). Violet de gentiane. Violet de méthyle B (violet de Bâle). Violet de méthyle 6 B. Violet de Paris. Violet dahlia.
Rouges	Fuchsine. Rubine. Safranine.
Verts	Vert de méthyle. Vert malachite.
Brun de Bismarck; Vésuvine.	

Dans les *couleurs acides*, au contraire, le principe colorant est un acide combiné à une base colorée ou non. Ce sont des *couleurs sans élection*, colorant indifféremment les différents protoplasma. La *fluorescéine* (éther phtallique de la résorcine), l'*éosine* (fluorescéine tétrabromée), l'*aurantia*, la *coccinine*, le *picro-carmin* sont les plus employées de ces couleurs.

Mordants. — En teinture, quand on veut fixer plus solidement une couleur sur un tissu, on emploie un agent intermédiaire, le mordant, qui, se combinant à la fois avec la matière colorante et le tissu, les réunit intimement l'un à l'autre.

Dans la coloration des microbes, on utilise également les mordants ; ils augmentent les affinités des matières colorantes pour les cellules et rendent la coloration plus rapide et plus durable ; les mordants ordinairement employés sont les suivants :

Acides. — Acide acétique, acide oxalique.
Phénol, créosote.
Tanin.
Iode, en solution iodo-iodurée.
Bichlorure de mercure.
Alcalins. — Potasse caustique, borate de soude, carbonate d'ammoniaque, alcalis organiques (aniline, toluidine).
Mélange de deux matières colorantes dont l'une joue le rôle de mordant par rapport à l'autre.

Action de la chaleur. — On peut encore augmenter la rapidité et la solidité de la coloration en chauffant entre 60° et 100° la préparation immergée dans le bain colorant.

I. — SOLUTIONS COLORANTES.

Les solutions colorantes employées en technique bactériologique sont très nombreuses ; chaque auteur ayant ses procédés préférés, il en résulte une complication et une multiplicité des formules qui embarrassent le débutant.

La technique a tout à gagner à une simplification dans ces solutions ; il suffit en réalité d'un petit nombre de formules pour satisfaire à tous les besoins. En s'attachant à connaître à fond l'emploi de quelques solutions, on évitera les échecs liés à l'usage d'une technique trop complexe et mal assurée.

Nous devons reproduire ici les différentes formules que l'on est exposé à rencontrer dans les travaux parus dans ces dernières années, mais nous aurons soin d'indiquer spécialement les procédés que nous recommandons et dont l'emploi suffit à tous les cas. Dans ce chapitre nous laisserons de côté les couleurs acides sur lesquelles nous aurons plus tard à revenir.

A. — SOLUTIONS SIMPLES.

Ces solutions ont un emploi assez restreint ; on leur préfère d'ordinaire les solutions mordancées.

A. — SOLUTIONS ALCOOLIQUES.

On les prépare en mêlant dans un flacon bouché à l'émeri :

Matière colorante	1 gramme.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.

Agiter, laisser reposer. Filtrer avant l'emploi.

Ces solutions ne sont pas utilisées en nature : elles servent à la préparation des solutions hydro-alcooliques. Elles se conservent fort longtemps à l'abri de la lumière. On doit tenir prêtes d'avance les solutions alcooliques de *fuchsine*, *krystal violet* ou *violet de gentiane* et *bleu de méthylène*.

B. — SOLUTIONS HYDRO-ALCOOLIQUES.

Se préparent en mélangeant :

Solution alcoolique filtrée	1 à 5 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Ces solutions sont d'un usage peu fréquent; elles se conservent mal; il convient de les filtrer au moment de s'en servir.

Il est plus simple de les préparer au moment du besoin en versant plusieurs centimètres cubes d'eau dans un godet en porcelaine et en y ajoutant quelques gouttes de la solution alcoolique filtrée jusqu'à obtention d'une pellicule irisée, à reflets métalliques, couvrant la surface du liquide.

C. — SOLUTIONS AQUEUSES.

Dans un petit flacon, mêler :

Matière colorante	0gr,25
Eau distillée	25 centimètres cubes.

Agiter, laisser déposer, filtrer. La solution est saturée, il doit rester un excès de matière colorante au fond du flacon.

Ces solutions se conservent très mal; on doit les préparer au moment du besoin; elles agissent lentement, mais donnent des colorations très nettes; elles sont peu employées.

Les solutions aqueuses de bleu de quinoléine, vésuvine, vert de méthyle, sont utilisées pour la coloration des microbes vivants.

B. — SOLUTIONS MORDANCÉES.

A. — SOLUTIONS PHÉNIQUÉES.

Ce sont les plus employées des solutions colorantes; elles se conservent très longtemps sans perdre de leur pouvoir colorant et sont applicables à tous les besoins de la technique.

Fuchsine phéniquée de Ziehl.

Fuchsine rubine	1 gramme.
Acide phénique neigeux	5 grammes.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Triturer dans un petit mortier de verre la fuchsine et l'alcool; ajouter l'acide phénique, mélanger; ajouter par petites portions, en continuant de remuer, les deux tiers de l'eau; verser dans un flacon; rincer le mortier avec le reste de l'eau; réunir les liquides. Laisser au contact 24 heures; filtrer dans un flacon propre, boucher à l'émeri.

Cette solution est trop concentrée pour la plupart des recherches; il faut la diluer ainsi qu'il suit :

Fuchsine de Ziehl diluée.

Mélanger :

Fuchsine de Ziehl	1 centimètre cube.
Eau distillée	6 à 10 centimètres cubes

Filtrer et préparer au moment du besoin; ne se conserve pas au delà de deux à trois jours.

Krystal violet phéniqué (Roux).

Krystal violet	1 gramme.
Acide phénique neigeux	2 grammes.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Préparer comme précédemment et s'emploie en nature; sert principalement à pratiquer la méthode de coloration de Gram.

Le krystal violet étant un composé cristallisé bien défini, ses préparations sont supérieures à celles du violet de gentiane, produit amorphe, de composition variable.

Violet de gentiane phéniqué (Nicolle).

Se prépare comme la solution précédente, en remplaçant le krystal violet par le violet de gentiane.

Peut sans inconvénient être supprimé de la technique.

Thionine phéniquée (Nicolle).

Thionine	0gr,50 à 1 gramme.
Acide phénique neigeux	2 grammes.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Préparer comme précédemment.

Solution recommandée pour la coloration des coupes et frottis ; elle colore un peu plus lentement, mais donne des préparations plus nettes que le krystal violet et le violet de gentiane. N'utiliser qu'une thionine de bonne qualité, sous peine de s'exposer à des mécomptes.

Bleu de méthylène phéniqué (Kühne).

Bleu de méthylène	1gr,5 à 2 grammes.
Acide phénique neigeux	2 —
Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Opérer comme précédemment.

B. — SOLUTIONS ANILINÉES.

Ces solutions se conservent mal et doivent être préparées au moment du besoin ; elles sont de moins en moins utilisées aujourd'hui : elles ne présentent aucun avantage sur les solutions phéniquées. La plus employée de ces solutions a été le *violet de gentiane aniliné d'Ehrlich.*

Pour l'obtenir, préparer d'avance :

Eau d'aniline.

Huile d'aniline	5 centimètres cubes.
Eau distillée	100 —

Mélanger dans un flacon en verre jaune; agiter fortement, laisser reposer. Au moment du besoin filtrer sur un papier préalablement mouillé. Bien veiller à ce qu'il ne passe pas de fines gouttelettes d'huile qui fausseraient les résultats de la coloration ; si cet accident se produisait, filtrer à nouveau la solution.

Violet aniliné d'Ehrlich.

Filtrer au-dessus d'un godet en porcelaine une dizaine de centimètres cubes d'eau d'aniline. Au filtrat ajouter quelques gouttes de solution alcoolique filtrée de violet de gentiane jusqu'à obtention

d'une pellicule irisée. Employer immédiatement. La solution doit être renouvelée chaque jour.

On préparerait de même la fuchsine, le krystal violet, le bleu de méthylène anilinés.

C. — SOLUTIONS ALCALINES.

Ces solutions ont été très employées en Allemagne ; aujourd'hui on n'utilise guère que le *bleu alcalin de Löffler.*

Bleu alcalin de Löffler.

Solution alcoolique de bleu de méthylène....	30	centimètres cubes.
Solution de potasse caustique à 1 p. 10 000..	100	—

Mêler dans un flacon; filtrer au moment du besoin ; s'altère rapidement par suite de la combinaison de KOH avec CO^2 de l'air.

Bleu alcalin de Kühne.

Solution alcoolique de bleu de méthylène....	30	centimètres cubes.
Solution de carbonate d'ammoniaque à $\frac{1}{100}$...	100	—

Mêler; filtrer au moment du besoin. Se conserve mieux que la solution précédente.

D. — COULEURS COMPOSÉES.

Le bleu composé de Roux est utilisé principalement pour les préparations du bacille de la diphtérie; il donne une coloration très fixe et très durable.

Bleu de Roux.

Violet dahlia..............................	1	gramme.
Vert de méthyle..........................	4	grammes.
Alcool absolu..............................	20	centimètres cubes.
Eau...	400	—

Triturer dans un mortier les matières colorantes et l'alcool, ajouter l'eau peu à peu, verser dans un flacon, laisser vingt-quatre heures en contact; filtrer; conserver dans un flacon bouché à l'émeri.

Telles sont les solutions colorantes les plus ordinairement employées ; au cours de cet ouvrage, nous aurons quelquefois l'occasion de citer d'autres solutions s'appliquant à des usages restreints ; nous donnerons alors les formules de ces préparations.

Les solutions d'un usage constant et que l'on doit toujours tenir préparées d'avance sont les suivantes :

Fuchsine de Ziehl.	Bleu phéniqué.
Krystal violet phéniqué.	Bleu alcalin.
Thionine phéniquée.	Bleu composé de Roux.

Remarque. — Les couleurs d'aniline possèdent une puissance de coloration intense ; elles tachent le linge, les doigts, etc. ; on doit éviter de les répandre et les manier avec précaution ; éviter d'agiter les couleurs pulvérulentes (bleu de méthylène, violet de gentiane, etc.). Les mains tachées par les couleurs d'aniline seront décolorées assez facilement par l'alcoolé de savon.

II. — COLORATIONS SIMPLES.

Pour pratiquer des colorations, il faut avoir constamment à portée de la main :

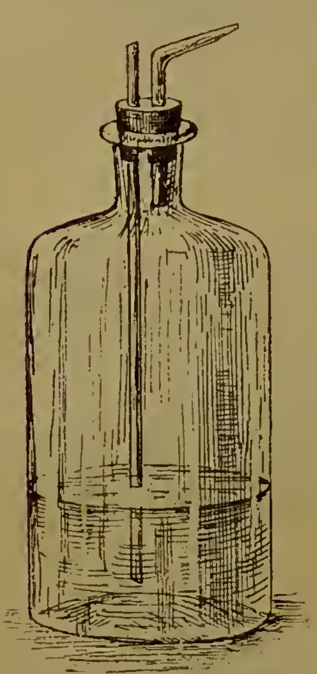


Fig. 95. — Pissette.

a. Plusieurs petits entonnoirs munis de filtres plissés ; les matières colorantes seront filtrées avant chaque utilisation et on en laissera tomber directement une goutte de l'entonnoir sur la préparation.

b. Une pissette (fig. 95) permet tant d'obtenir l'écoulement du liquide par simple inclinaison du flacon. La pissette contient de l'eau fraîchement filtrée au Chamberland.

c. Un grand cristallisoir en verre pour recueillir les liquides de lavage.

d. Des lames, lamelles, une pince de Cornet, des *öse*, une compresse fine, de petits carrés de papier filtre.

e. Un bec de Bunsen à veilleuse.

Les microbes peuvent être colorés vivants (à l'état frais), ou après dessiccation.

A. — COLORATION DES MICROBES VIVANTS.

La coloration des microbes vivants permet de les rendre plus accessibles à l'observation microscopique, tout en conservant leur motilité.

Pour obtenir cette coloration, on utilise des solutions aqueuses de couleurs dépourvues d'action toxique sur les microbes : on donne la préférence à la vésuvine (Metchnikoff), au vert de méthyle (Babès), au bleu de quinoléine, à la fuchsine, etc.

Opération. — Opérer comme pour l'examen sans coloration ; mais après avoir placé la lamelle sur la lame, disposer sur un des bords de la lamelle une goutte de la solution aqueuse de matière colorante : la solution pénètre par capillarité et colore les microbes.

On peut encore, après avoir déposé la goutte de culture sur la lamelle, y ajouter avec une pipette fine une gouttelette de la solution colorante, puis mélanger avec l'extrémité de la pipette, renverser sur la lame et examiner.

B. — COLORATION DES PRÉPARATIONS SÈCHES.

C'est le procédé qui permet le mieux de juger des caractères morphologiques des microbes ; de plus il donne des préparations durables pouvant être conservées fort longtemps.

Opération. — 1° Déposer une goutte de la culture en bouillon sur

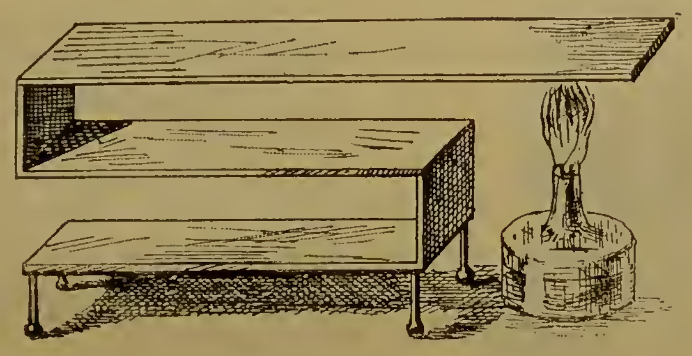


Fig. 96. — Platine de Koch.

la lamelle tenue avec la pince de Cornet. Étaler avec l'extrémité de la pipette, *ou* :

Déposer une goutte d'eau filtrée sur la lamelle, et y délayer une trace de la culture sur milieu solide. Étaler avec l'öse.

2° Dessécher à une douce chaleur, soit en maintenant la lamelle à une certaine hauteur au-dessus de la veilleuse du bec de Bunsen, soit en la plaçant sur une *platine de Koch* (fig. 96) chauffée à 45°-50°.

Avoir soin pendant la dessiccation d'étaler constamment le liquide sur la lamelle pour éviter la production de cercles concentriques.

3° Pour que les microbes ne se détachent pas de la lamelle pendant les lavages, *fixer* : *a*) en passant rapidement, à deux ou trois reprises dans la flamme chauffante du bec de Bunsen, la lamelle dont la face enduite est tournée en haut ; ce procédé a l'inconvénient de déformer, de ratatiner les bactéries ; — *b*) en versant sur la face enduite de la lamelle deux ou trois gouttes d'alcool éther ; laisser évaporer ; ce procédé doit être préféré au précédent ; il ne déforme pas les microbes.

Alcool éther.

Alcool absolu..............................	50 centimètres cubes.
Éther rectifié.............................	50 —

4° Faire tomber du filtre deux à trois gouttes de solution colorante sur la préparation ; avoir soin que le liquide ne passe pas à la face inférieure de la lamelle (employer la fuchsine de Ziehl diluée, la thionine phéniquée, ou le bleu alcalin, etc.).

Laisser en contact quinze à trente secondes.

5° Laver en faisant tomber avec la pissette un filet d'eau sur un des coins de la lamelle ; ne jamais verser l'eau directement sur le centre de la préparation pour ne pas entraîner les microbes.

6° Examiner :

a. Extemporanément, dans l'eau, en portant immédiatement la lamelle sur une lame.

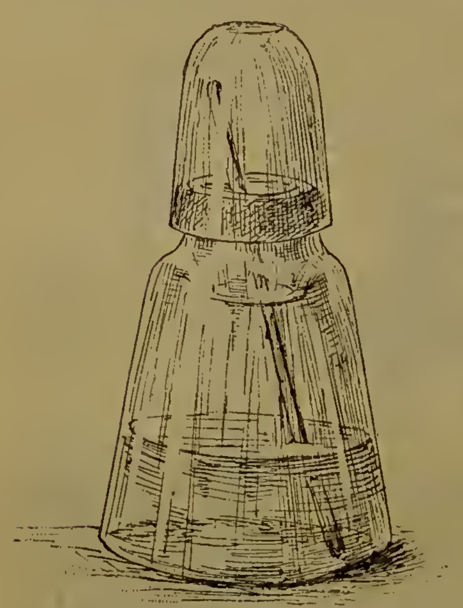


Fig. 97. — Flacon à baume de Canada.

b. Après dessiccation et montage au baume de Canada ; pour cela, sécher la lamelle à l'air ou à une douce chaleur, déposer alors sur la face enduite une goutte de baume prise au bout d'une baguette de verre, appliquer sur une lame et presser légèrement pour étaler le baume.

Pratiquer l'examen de préférence avec l'objectif 1/12 et l'oculaire I ou II.

Quand on fait un examen dans l'eau, essuyer soigneusement la face supérieure de la lamelle avec un linge fin avant d'y placer la goutte d'huile de cèdre nécessaire pour l'emploi de l'objectif.

En résumé :

Étaler sur la lamelle la goutte de culture, *sécher*, *fixer*, *colorer*, *laver à l'eau*, *sécher*, *monter au baume*, *examiner*.

Remarque. — *a.* Il est de première importance de toujours se rappeler au cours des manipulations quelle est la face de la lamelle qui est enduite de culture ; quand on a perdu cette face, il est quelquefois malaisé de la retrouver ; on y arrive en frottant légèrement le voisinage des bords de la lamelle avec une pointe d'aiguille : on produit ainsi du côté de la face enduite des éraillures faciles à reconnaître. On évite ces désagréments en tenant la lamelle avec la pince de Cornet dont l'un des mors est muni

'un petit bouton frappé dans le métal; le bouton devra toujours être enu en haut et correspondre à la face de la lamelle recouverte de nicrobes.

b. Ne déposer sur la lamelle qu'une très petite quantité de culture : on ugc mieux de la forme des microbes quand il n'y a qu'un petit nombre l'individus par champ de microscope.

c. Employer le baume du Canada dissous dans le xylol ; la solution devra voir une consistance sirupeuse telle qu'elle ne file pas quand on en pré-·ve une goutte avec un agitateur; on conserve le baume dans un flacon ermé par un bouchon-cloche en verre et muni d'un rebord qui permet l'égoutter l'excès de baume emporté par l'agitateur (fig. 97).

d. L'alcool éther, l'alcool et en général tous les réactifs volatils seront onservés de préférence dans des flacons compte-gouttes bouchant à émeri et appartenant à l'un des nombreux modèles que l'on trouve dans e commerce; donner la préférence aux flacons de forme basse, en verre pais et de contenance de 60 à 100 centimètres cubes.

III. — MÉTHODE DE COLORATION DE GRAM.

Gram a imaginé une méthode de coloration qui permet de classer es bactéries en deux groupes.

Quand on colore certaines bactéries par une couleur basique en olution anilinée ou phéniquée, et que l'on fait agir ensuite sur la réparation un mordant spécial à base d'iode, ces bactéries ne sont lus susceptibles de se décolorer par l'action de dissolvants tels que 'alcool absolu; c'est le cas de la *bactéridie charbonneuse*, par exemple.

Au contraire d'autres bactéries, traitées de la même façon, se laissent décolorer facilement par l'alcool absolu : c'est ce qui se produit pour le bacille typhique par exemple.

On caractérise les bactéries suivant la façon dont elles se comportent vis-à-vis de cette réaction : on dit qu'elles *prennent le Gram* quand elles restent colorées, et au contraire, qu'elles ne *prennent pas le Gram* quand elles se décolorent. La bactéridie charbonneuse prend le Gram, le bacille d'Eberth ne prend pas le Gram.

Le mordant utilisé a la composition suivante :

Liquide de Gram.

Iode	1 gramme.
Iodure de potassium	2 —
Eau distillée	300 centimètres cubes.

Dans le procédé type on emploie comme décolorant l'alcool absolu dans certains cas on peut lui substituer l'*huile d'aniline pure* ou mieux l'*alcool acétone* (Nicolle).

Alcool acétone.

Alcool absolu	2 parties.
Acétone	1 —

La méthode de Gram a subi de nombreuses modifications et es utilisée pour pratiquer des doubles colorations dans les frottis, le coupes, etc. ; nous étudierons ces applications dans un chapitr spécial ; pour le moment nous nous en tiendrons à l'exposé de la méthode classique employée comme procédé de diagnostic.

Opération. — 1° Préparer une lamelle sèche selon les procédé ordinaires.

2° Colorer pendant quinze à trente secondes avec la solution co lorante ; nous recommandons le krystal violet phéniqué.

3° Rejeter l'excès de matière colorante (ne pas laver), puis dépose sur la préparation deux ou trois grosses gouttes du liquide de Gram laisser en contact quatre à six secondes. La préparation prend une teinte brune.

4° Laver à l'eau, sécher.

5° Verser goutte à goutte de l'alcool absolu sur la lamelle pendant dix à trente secondes suivant les cas (intensité, durée d'action de la matière colorante, nombre de microbes, etc.).

6° Laver rapidement à l'eau.

7° Examiner la préparation dans l'eau. Si les microbes prennent le Gram ils sont colorés en violet intense ; dans le cas contraire on les aperçoit décolorés : quelquefois certains individus sont décolorés les autres présentant encore une légère teinte violette, il suffira alors d'un nouveau lavage de quelques secondes à l'alcool absolu pour terminer la réaction.

Pour conserver la préparation, sécher et monter dans le baume.

En résumé :

Préparer une lamelle sèche, colorer, traiter par la solution iodurée laver, sécher, traiter par l'alcool, laver, examiner.

Remarques. — *a.* Le temps 5, correspondant à la décoloration, est d'une exécution délicate, sa durée varie selon la matière colorante employée, son temps de contact etc. ; on n'arrivera à une réussite complète qu'après quelques tâtonnements; l'habitude et un certain tour de main constituent mieux que toutes les règles l'élément capital de succès. Bien savoir que, si une décoloration insuffisante peut induire en erreur, on pourrait arriver à décolorer même les bactéries les plus résistantes en prolongeant outre mesure le contact de l'alcool.

b. Les préparations traitées par la méthode de Gram se conservent moins bien que celles qui sont colorées par les procédés ordinaires : elles se dé-colorent à la longue.

IV. — MÉTHODE DE CLAUDIUS.

Claudius a récemment proposé une méthode de coloration qui présente tous les avantages du procédé de Gram, mais est d'une application plus aisée et donne des résultats plus constants que ce dernier. C'est ainsi, par exemple, que le *vibrion septique* et le *bacille du charbon symptomatique*, qui prennent le Gram d'une façon très inconstante, se colorent toujours par la méthode de Claudius.

Nous avons répété les recherches de Claudius et nos résultats confirment pleinement ceux qu'a obtenus ce savant. Sa méthode présente, en outre, un grand avantage pour les élèves : les débutants ne savent jamais à quel moment ils doivent arrêter la décoloration, dans la méthode de Gram : tantôt ils laissent agir l'alcool trop longtemps, tantôt, au contraire, ils enlèvent trop tôt l'agent décolorant et, dans les deux cas, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants ; cet inconvénient ne se présente pas avec la méthode de Claudius.

La méthode de Claudius nécessite l'emploi : 1° d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de violet de méthyle 6 B (ou de la solution de violet de gentiane phéniquée) ; 2° d'une solution d'acide picrique :

Solution saturée d'acide picrique	1 vol.
Eau distillée	1 —

Opération. — 1° Préparer une lamelle sèche, comme d'ordinaire.

2° Colorer pendant une minute avec la solution de violet.

3° Laver à l'eau, égoutter l'excès d'eau.

4° Faire agir pendant une minute la solution picriquée ; puis enlever avec un morceau de papier filtre.

5° Décolorer avec du chloroforme ou de l'essence de girofle jusqu'à ce que le réactif ne se teinte plus en bleu.

6° Examiner dans l'essence de girofle ou monter dans le baume.

Les bactéries suivantes prennent le Gram et le Claudius : *staphylocoques pyogènes*, *streptocoque pyogène*, *pneumocoque*, *bacille de la diphtérie*, *bacille du charbon*, *bacille du tétanos*, *bacille du charbon symptomatique*, *vibrion septique*, etc., etc. Au contraire, le *bacille d'Eberth*, le *bacille du côlon*, le *vibrion du choléra*, le *pneumobacille*, le *gonocoque*, le *bacille du pus bleu*, etc., ne se colorent pas par ces méthodes.

CHAPITRE IX

COLORATION DES SPORES, DES CAPSULES ET DES CILS

A. — SPORES.

Certaines bactéries, à un moment de leur existence, montrent à l'intérieur de leur protoplasma un petit point brillant, réfringent, réfractaire aux couleurs d'aniline, c'est la *spore* ou plus exactement l'*endospore* (découverte par Pasteur).

La formation de l'endospore n'a pas lieu chez un certain nombre de bactéries et en particulier chez les coccus; la forme durable de ces microbes est l'*arthrospore* : une cellule augmente sa membrane d'enveloppe, la rend plus résistante et capable de résister aux agents de destruction. Les arthrospores présentent les mêmes réactions colorantes que les microbes correspondant.

Nous n'avons donc à insister que sur la coloration des endospores. La bactéridie charbonneuse, le *bacillus megaterium*, le vibrion septique, le bacille du tétanos, le *bacillus subtilis*, etc., sont les microorganismes chez lesquels on étudie d'ordinaire les spores.

Les spores sont mises en liberté par la mort et la destruction du bacille qui leur a donné naissance. Elles sont entourées d'une membrane très résistante qui les soustrait à l'action de la plupart des agents de destruction et empêche leur pénétration par les solutions colorantes ordinairement employées.

I. — EXAMEN SANS COLORATION.

La spore se présente comme une petite granulation réfringente, sphérique ou ovoïde, située dans l'intérieur du protoplasma cellulaire et entourée d'un anneau de substance claire. La spore est toujours plus petite que la cellule mère; une cellule mère ne donne jamais qu'une seule spore. La spore étant formée est mise en liberté par la

disparition du protoplasma cellulaire autour d'elle. La germination de la spore donne naissance à une nouvelle bactérie.

Tous ces phénomènes s'observent très facilement chez la bactéridie charbonneuse dans une culture en goutte suspendue faite sous le microscope (Voy. p. 133); quand on veut simplement rechercher l'existence des spores chez une bactérie, on fait une préparation sur lame ordinaire, comme nous l'avons indiqué page 130.

II. — COLORATION DES SPORES.

Quand on fait subir l'action de solutions colorantes aqueuses ou hydroalcooliques à une bactérie sporulée, les spores restent incolores formant des taches claires dans les bâtonnets colorés.

On peut arriver à colorer les spores à l'aide de procédés spéciaux.

A. — COLORATION SIMPLE.

Par cette méthode on se propose de colorer de la même façon les bacilles et les spores; elle est applicable particulièrement aux *Clostridium* et aux *bacilles en épingle*.

a. **Procédé recommandé**. — 1° Préparer une lamelle avec la culture à examiner. Sécher.

2° Passer dix fois la lamelle, la face enduite de culture tournée en haut, dans la flamme chauffante d'un bec de Bunsen, assez rapidement pour ne pas charbonner la préparation.

3° Colorer avec le violet phéniqué.

4° Laver; monter au baume; examiner. Les bactéries et les spores sont colorées en violet.

b. **Procédé à l'acide chromique**. — 1° Préparer une lamelle; sécher.

2° Déposer sur la lamelle et y laisser pendant quatre à cinq minutes une grosse goutte d'une solution d'acide chromique à 1/20.

3° Laver à l'eau.

4° Colorer au violet phéniqué.

5° Laver; monter; examiner.

B. — DOUBLE COLORATION.

On se propose de colorer différemment, de *différencier* les bacilles et les spores.

Les spores se colorent difficilement, mais une fois colorées retiennent avec énergie les matières colorantes et résistent à l'action des substances qui décolorent les bacilles.

Procédé recommandé. — 1° Préparer une lamelle ; sécher ; fixer en passant rapidement deux à trois fois dans la flamme.

2° Déposer sur la lamelle une grosse goutte de fuchsine de Ziehl, porter au-dessus d'une petite flamme ; chauffer jusqu'à apparition de vapeurs ; approcher et éloigner de la flamme de manière à prolonger pendant quatre à cinq minutes l'action du liquide chaud. Les spores et les bactéries se colorent en rouge intense.

3° Laver à l'eau.

4° Faire agir sur la lamelle pendant quelques secondes une solution au 1/4 d'acide nitrique :

Acide nitrique pur..	1 partie.
Eau distillée..	3 —

Les bacilles se décolorent ; les spores restent colorées.

5° Laver à grande eau.

6° Déposer sur la préparation une goutte de solution aqueuse de bleu de méthylène ; laisser en contact vingt à trente secondes. Les bacilles précédemment décolorés fixent le bleu.

7° Laver. Sécher. Monter au baume. Les bacilles sont colorés en bleu, les spores en rouge.

Cette méthode donne d'excellents résultats avec le B. *megaterium* ; elle réussit moins bien avec la bactéridie charbonneuse pour laquelle il est préférable d'utiliser comme décolorant (temps 4) l'alcool absolu. — La décoloration, d'ailleurs, constitue le point délicat de cette manipulation ; après quelques tâtonnements on arrivera à déterminer le temps nécessaire pour obtenir la décoloration des différents bacilles tout en conservant la coloration de leurs spores.

B. — CAPSULES.

Certains microbes sont entourés d'une zone hyaline brillante, ou *capsule*, que l'on peut mettre en évidence par des procédés spéciaux de coloration ; le microbe est alors fortement coloré et autour de lui apparaît la capsule pâle avec un bord faiblement teinté.

Nous décrirons deux procédés de coloration des microbes capsulés.

a) 1° Préparer une lamelle, sécher, fixer.

2° Colorer avec une goutte de violet phéniqué pendant 30 secondes.

3° Laver très rapidement avec l'alcool acétone au 1/3.

4° Laver à l'eau, sécher ; monter au baume.

b) 1° Préparer une lamelle, sécher, fixer.

2° Colorer avec une goutte du mélange suivant :

Violet acétisé.

Acide acétique...........................	1 gramme.
Solution alcool. { de violet de gentiane / ou de krystal violet. } ..	5 centimètres cubes.
Eau distillée............................	100 —

Laisser agir trente à soixante secondes.

3° Laver. Sécher. Monter au baume.

Ces procédés suffisent dans la presque majorité des cas; toutefois la coloration des microbes encapsulés, dans les coupes, exige des procédés spéciaux que nous étudierons plus loin (Voy. p. 307).

C. — CILS.

Les *cils vibratiles* ou *flagella*, organes de mouvement des bactéries mobiles, ne sont visibles à l'état frais et sans coloration que chez certaines espèces de grande taille telles que les sulfobactéries (*bacterium photometricum*, *beggiatoa roseopersinica*, etc.), chez toutes les autres bactéries on ne peut les voir qu'en utilisant des procédés complexes de coloration.

Koch donna le premier un procédé, fort imparfait d'ailleurs et abandonné aujourd'hui, de coloration des cils des microbes desséchés; Löffler, Trenkman, Sclavo, Remy et Sugg, Nicolle et Morax, Van Ermengen ont indiqué depuis des procédés plus satisfaisants; Straus enfin a fait connaître un procédé de coloration des cils chez les bactéries vivantes.

A. — COLORATION DES CILS DES BACTÉRIES VIVANTES. PROCÉDÉ DE STRAUS.

1° Prélever une goutte de culture en bouillon et la déposer sur une lame de verre.

2° Y ajouter une goutte de solution de Ziehl étendue de 3 à 4 parties d'eau, bien mélanger la culture avec la goutte colorante.

3° Couvrir avec une lamelle et examiner immédiatement avec l'objectif à immersion.

On voit les bacilles colorés en rouge intense et les cils teintés en rose pâle avec des grains rouges plus foncés disposés en série le long du flagellum; les cils apparaissent surtout sur les bacilles bien vivants et très mobiles.

Ce procédé, très expéditif, ne réussit qu'avec certains microbes, principalement le vibrion du choléra, le vibrion de Finkler-Prior, le *vibrio Metchnikowi*; il échoue à colorer les cils d'un grand nombre de bactéries (bacille typhique, *b. coli commune*, *b. subtilis*, par exemple).

B. — COLORATION DES CILS DES BACTÉRIES DESSÉCHÉES.

RÈGLES GÉNÉRALES.

1° Prendre une petite quantité de culture récente sur gélose et la délayer dans un verre de montre rempli d'eau ordinaire (préférable à l'eau distillée) de manière à obtenir une suspension à peine trouble et absolument homogène.

2° Déposer avec une pipette une goutte de cette émulsion sur une lamelle scrupuleusement propre tenue avec une pince de Cornet. (Laver la lamelle comme il a été dit page 127 puis la flamber fortement dans la flamme chaude du bec de Bunsen.) Si la lamelle n'était pas absolument propre le liquide ne s'y répandrait pas également.

3° En inclinant la lamelle dans tous les sens, répartir le liquide à sa surface, puis aspirer avec la pipette l'excès de liquide qui se rassemble à l'angle inférieur de la lamelle.

4° Laisser sécher à la température ordinaire, à l'abri des poussières. Ne pas fixer.

La lamelle est alors prête à subir l'action des liquides colorants employés suivant l'une des méthodes que nous allons exposer.

En observant ces règles on obtient une dilution telle que chaque champ du microscope ne contient qu'un petit nombre de bactéries, condition indispensable pour une bonne observation, de plus on élimine autant qu'il est possible les matières muqueuses qui agglomèrent les microbes dans les cultures et forment sur la lamelle des précipités abondants obscurcissant la préparation.

I. — PROCÉDÉ DE LÖFFLER.

La mise en œuvre de ce procédé exige les réactifs suivants :

Encre de fuchsine.

Solution aqueuse de tanin à 20 pour 80......	10	centimètres cubes.
Solution aqueuse saturée à froid de sulfate de fer..................................	5	—
Solution alcoolique saturée de fuchsine.......	1	—

Mêler. Ne pas filtrer. Cette solution doit être employée fraîche.

Solution alcaline.

Soude pure..................................	1	gramme.
Eau distillée................................	100	centimètres cubes.

Solution acide.

Acide sulfurique pur........................	1 gramme.
Eau distillée................................	100 centimètres cubes.

Solution colorante.

Eau d'aniline..............................	100 centimètres cubes.
Solution de soude à 1 p. 100.............	1 —
Violet de gentiane ou fuchsine...........	4 à 5 grammes.

Agiter; laisser en contact quelques heures; filtrer.

Opération. — 1° *Mordançage.* — Déposer sur la lamelle préparée comme il a été dit plus haut une grosse goutte d'encre de fuchsine additionnée, suivant le microbe dont on veut colorer les cils, d'un certain nombre de gouttes de la solution acide ou de la solution alcaline. Chauffer sur la veilleuse du bec Bunsen jusqu'à dégagement de vapeurs sans atteindre l'ébullition et pendant trente à cinquante secondes.

La quantité des solutions alcaline ou acide à ajouter à 16 centimètres cubes d'encre de fuchsine ont été déterminées par tâtonnements. Nous indiquons ci-dessous les chiffres qui se rapportent aux principales bactéries ciliées :

Mordant sans addition aucune.............	Spirillum concentricum.
+ 1/2 à 1 goutte solution acide....	Virus du choléra.
+ VI gouttes.....................	Bacille pyocyanique.
+ XVIII à XX gouttes sol. alcaline.	Micrococcus agilis.
+ XX gouttes....................	Charbon symptomatique.
+ XX à XXX gouttes.............	Bacille typhique.
+ XXVIII à XXX gouttes.........	Bacillus subtilis.
+ XXVI à XXVIII gouttes	Vibrion septique.
+ { de XX gouttes solution acide / à XV gouttes solution alcaline. }	Bacille du lait bleu.

Ce temps de la préparation est fort complexe, très délicat et expose à de nombreux insuccès.

2° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

3° *Coloration.* — Déposer sur la lamelle une goutte de la solution colorante; chauffer jusqu'à dégagement de légères vapeurs pendant environ une minute.

4° Laver à grande eau, examiner la préparation dans l'eau; si elle est bonne, sécher et monter au baume.

Le procédé de Löffler, longtemps classique, exige des tâtonnements très longs, et donne des résultats très incertains. Les préparations sont souvent obscurcies par un précipité très abondant qui empêche de distinguer les cils.

II. — PROCÉDÉ DE REMY ET SUGG.

Ce procédé, qui n'est qu'une modification de celui de Löffler, a pour but d'éviter les précipités granuleux que nous avons signalés.

Ici l'encre de fuchsine est employée à froid, son action est suivie de celle d'une solution iodurée et le bain colorant suivant est substitué à celui de Löffler :

Solution colorante.

Eau phénylaminée	20 centimètres cubes.
Solution alcoolique de violet de gentiane	1 goutte.
Eau distillée	5 centimètres cubes.

Déposer la goutte de solution alcoolique dans l'eau distillée, puis mêler à l'eau phénylaminée.

Opération. — 1° *Mordançage.* — Opérer comme dans le procédé de Löffler, mais ne pas chauffer et maintenir le contact du mordant et de la lamelle pendant quinze à trente minutes.

2° Rejeter le mordant et le remplacer immédiatement par une goutte de liquide de Gram.

3° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

4° Déposer la lamelle dans un verre de montre rempli de la solution colorante; laisser en contact une demi-heure de préférence à l'étuve à 37°.

5° Laver à l'eau. Examiner dans l'eau. Sécher. Monter dans le baume.

III. — PROCÉDÉS DE NICOLLE ET MORAX.

Procédé recommandé.

Ce procédé, simplification de celui de Löffler, supprime l'emploi si délicat des solutions acides et alcalines et permet d'obtenir très aisément des préparations satisfaisantes des cils de tous les microbes mobiles. Au colorant de Löffler on substitue ici la fuchsine de Ziehl.

1° *Mordançage.* — Déposer sur la lamelle une grosse goutte d'encre de fuchsine (sans addition d'aucune sorte); chauffer une dizaine de secondes sur la flamme de la veilleuse.

Dès que des vapeurs apparaissent jeter le mordant, incliner la lamelle et faire tomber sur l'angle supérieur le jet d'une pissette pour bien laver la préparation sans entraîner la couche de microbes.

Recommencer deux à trois fois les mêmes opérations (mordançage et lavage).

Après chaque lavage avoir soin d'essuyer la face inférieure de la lamelle et les mors de la pince de Cornet, sans quoi, lors du mordan-

çage suivant, l'encre de fuchsine s'écoulerait sous la lamelle et le long de la pince.

2° *Coloration.* — Mettre une goutte de fuchsine de Ziehl sur la lamelle; chauffer une ou deux fois jusqu'à apparition de vapeurs pendant quinze secondes.

3° Laver à l'eau, examiner dans ce liquide ; si la préparation est réussie, sécher et monter dans le baume.

IV. — PROCÉDÉ DE TRENKMANN.

Mordançage. — 1° Déposer la lamelle et la laisser six à huit heures dans le bain suivant :

Tanin	2 grammes.
Eau distillée	100 centimètres cubes.
Acide chlorhydrique	IV gouttes.

2° Laver à l'eau, puis plonger la lamelle dans un verre de montre contenant une solution saturée d'iode métallique dans de l'eau distillée.

Laisser en contact une heure.

3° Laver à l'eau.

4° *Coloration.* — Placer la lamelle pendant trente minutes dans un bain de violet aniliné d'Ehrlich.

5° Laver à l'eau, examiner, sécher, monter dans le baume.

Ce procédé donne des résultats satisfaisants, mais il n'est pas assez expéditif pour pouvoir être employé couramment.

V. — PROCÉDÉ DE SCLAVO.

Mordançage. — 1° Déposer sur la lamelle une grosse goutte du mordant suivant :

Alcool à 50°	100 centimètres cubes.
Tanin	1 gramme.

Laisser en contact une minute, puis laver à l'eau.

2° Déposer sur la lamelle une goutte de la solution suivante :

Acide phospho-tungstique	5 grammes.
Eau	100 centimètres cubes.

3° Laisser en contact une minute. Laver rapidement à l'eau.

4° *Coloration.* — Mettre sur la lamelle une goutte de violet aniliné d'Ehrlich ; chauffer jusqu'à apparition de légères vapeurs pendant trois à cinq minutes.

5° Laver, examiner, sécher, monter dans le baume.

Le procédé de Sclavo échoue à colorer les cils d'un certain nombre de microbes, particulièrement ceux du V. du choléra, nous n'avons pas davantage réussi à colorer ceux du *bacterium coli*.

VI. — PROCÉDÉ DE VAN ERMENGEN.

(*Procédé recommandé.*)

Ce procédé, très délicat et qui donne de très belles préparations, est basé sur la réduction du nitrate d'argent au niveau des cils des bactéries.

1° Placer la lamelle pendant une minute à 50° ou trente minutes à froid dans le bain suivant :

Solution aqueuse d'acide osmique à 2 p. 100.	8 centimètres cubes.
Solution aqueuse de tanin à 10 p. 100.......	16 —
Acide acétique cristallisable.................	1 goutte.

A préparer au moment du besoin.

2° Laver à l'eau, puis à l'alcool absolu.

3° Placer la lamelle pendant une à deux minutes dans le bain d'argent.

Nitrate d'argent cristallisé.................	1 gramme.
Eau distillée................................	200 centimètres cubes.

4° Porter la lamelle, sans la laver, dans le bain réducteur.

Acide gallique...............................	5 grammes.
Tanin..	3 —
Acétate de soude fondu.......................	10 —
Eau distillée................................	350 centimètres cubes.

Laisser en contact une minute environ.

5° Sans laver, reporter la lamelle dans le bain d'argent et l'y agiter jusqu'à ce que celui-ci prenne une teinte noire.

6° Laver, sécher, monter dans le baume.

CHAPITRE X

LES INOCULATIONS

A. — CHOIX DES ANIMAUX.

Les animaux destinés à être inoculés sont choisis, de préférence armi les mammifères, plus rarement parmi les autres vertébrés, 'après des considérations de plusieurs sortes.

1° **Réceptivité.** — Il faut, avant tout, choisir un animal se prêtant à 'expérience qu'on entreprend; si l'on veut reproduire une maladie faut s'adresser à un animal réceptif au microbe qui cause cette ıaladie; dans d'autres cas, au contraire, on prendra un animal éfractaire et, par divers moyens, on s'efforcera de lui faire perdre immunité dont il jouit. Il faut donc être fixé sur la réceptivité des ifférents animaux que l'on utilisera, et dans la deuxième partie e cet ouvrage nous aurons l'occasion d'indiquer les espèces réceptives aux principaux microbes. Quand on étudie un microbe nouveau t que l'on veut déterminer ses propriétés pathogènes, on conçoit u'il y ait intérêt à multiplier les inoculations et à s'adresser au lus grand nombre possible d'espèces animales.

2° **Considérations économiques.** — L'expérimentateur est obligé, ans la majorité des cas, d'utiliser de petits animaux, que l'on peut e procurer facilement, à bas prix, conserver et nourrir à peu de rais et, au besoin, faire reproduire au laboratoire.

3° **Maniement.** — On s'adresse de préférence à des animaux de nœurs douces, faciles à manier et ne nécessitant pas l'emploi d'apareils de contention compliqués.

Les petits rongeurs, tels que le *lapin*, le *cobaye*, la *souris blanche*, sont es plus ordinairement employés; on se les procure facilement et ils ont réceptifs vis-à-vis de la plupart des microbes pathogènes. Ce sont ux que l'on désigne d'ordinaire par le terme : *animaux de laboratoire*.

On utilise encore fréquemment le *rat blanc*, la *souris grise*, et nême le *surmulot*; plus rarement, le *chien*, peu réceptif vis-à-vis des

microbes pathogènes pour l'homme, le *chat*, difficile à manier, le *mouton*, la *chèvre*, le *singe*, enfin l'*âne*, le *cheval* et les *bovidés*.

B. — CONSERVATION DES ANIMAUX.

L'écurie, pièce indispensable à tout laboratoire, doit être spacieuse, bien aérée, pourvue de conduites d'eau permettant d'y opérer de fréquents lavages.

Les cages seront, autant que possible, métalliques ; il est préférable qu'elles ne soient pas superposées, les liquides des cages supérieures pouvant alors souiller les cages inférieures. Si le défaut d'espace forçait à superposer les cages, il serait nécessaire d'interposer entre les différents étages un plancher métallique incliné et pourvu de chéneaux pour permettre l'écoulement des urines. Le fond des cages est toujours à claire-voie.

Les animaux et particulièrement les lapins, souris et rats sont sensibles au froid et à l'humidité ; l'écurie doit être sèche et susceptible d'être chauffée en hiver.

Les cages doivent être nettoyées chaque jour ; fréquemment, et particulièrement après chaque décès, elles seront lavées avec une solution antiseptique forte (crésyl, acide phénique) ou mieux encore flambées avec soin avec un fort bec de gaz ou de l'alcool à brûler.

Les animaux inoculés doivent être isolés ; à la porte de leur cage on fixe une étiquette indiquant la nature et la date de l'inoculation.

Les lapins, cobayes, rats blancs et souris blanches se reproduisent facilement au laboratoire ; il est bon de séparer les mâles des femelles pleines car ils détruisent souvent les nichées ; cette précaution, indispensable pour le lapin et la souris, est moins utile pour le rat blanc et surtout pour le cobaye.

Les rats gris, les souris de maison ou des champs, doivent, en règle, être conservés séparément ; quand on réunit plusieurs individus dans une même cage ils se battent, se font des blessures graves et se tuent fréquemment. Ces animaux doivent être placés dans de grands bocaux à large ouverture fermés par un couvercle en toile métallique assujetti autour du goulot au moyen d'un cercle de fil de fer.

Les rats blancs, d'ordinaire très doux, peuvent être placés dans les cages en fer à grillage serré, ou même dans des caisses en bois avec porte en toile métallique ou des cages à oiseaux.

Les souris blanches seront conservées dans des bocaux de verre ou dans des caisses métalliques, telles que des boites à Palmers, dont le couvercle aura été percé de nombreux trous. Ces boites et

bocaux doivent être munis d'une couche de sciure de bois épaisse de plusieurs centimètres et d'une certaine quantité d'ouate, les souris redoutant le froid.

Il est inutile d'insister sur la nourriture des animaux tels que lapins, cobayes, chiens, équidés, bovidés. Les souris recevront du grain et du pain mouillé ; de même les rats ; ces derniers animaux aimant beaucoup l'eau on devra en déposer une petite écuelle dans leur cage.

Les animaux de laboratoire sont sujets à un certain nombre de maladies contagieuses qui dépeuplent quelquefois les écuries; il importe de connaître les plus fréquentes de ces affections.

Abcès. — Les lapins présentent fréquemment, sur les diverses régions du corps, des abcès volumineux formés par un pus concret et fétide et qui entraînent à la longue un état cachectique et la mort. Cette affection est contagieuse.

Isoler l'animal malade ; désinfecter la cage avec soin. Ouvrir l'abcès, le vider, au besoin en gratter les parois à la curette; puis pratiquer des irrigations et des pansements antiseptiques.

Acarus des oreilles. — Un acarus se développe parfois dans le conduit auditif du lapin ; bientôt il envahit l'oreille moyenne et détermine des troubles nerveux graves : mouvements giratoires, convulsions, crises épileptiformes, qui aboutissent à la mort. On aperçoit dans les oreilles du lapin malade des croûtes jaunâtres qui, portées sous le microscope (oc. 1, obj. IV) se montrent constituées par quelques débris amorphes et de très nombreux acarus. L'affection est éminemment contagieuse; elle est curable à la condition d'être traitée dès le début.

Aussitôt qu'un cas a été constaté dans une écurie, isoler et traiter le malade ; désinfecter la cage qu'il occupait et les cages voisines et examiner fréquemment les oreilles de tous les autres lapins de l'écurie. Dès qu'on a constaté la présence de l'acarus dans l'oreille d'un animal, commencer le traitement : chaque jour débarrasser le conduit auditif des croûtes à l'aide d'un écouvillon formé par un peu d'ouate enroulée sur un petit bâton, puis faire tomber dans l'oreille quelques gouttes d'une solution à 5 p. 1000 de polysulfure de potassium (foie de soufre).

Septicémies. — Les lapins et les cobayes sont exposés à plusieurs affections épidémiques qui, trop souvent, ravagent les écuries en quelques jours.

Le plus fréquemment les lapins et les cobayes sont frappés en même temps : ils présentent du jetage, puis le poil se hérisse, l'animal se pelotonne, survient de la diarrhée et la mort arrive rapidement. A l'autopsie on trouve des lésions de broncho-pneumonie; l'affection semble due à un petit bacille ressemblant, quant à la forme, à celui de Pfeiffer.

Une autre maladie épidémique, due également à un bacille, atteint quelquefois le lapin ; ici l'infection semble se faire par le tube digestif au moyen des matières fécales souillant le plancher des cages et les aliments. Les animaux succombent rapidement après avoir présenté de la diarrhée et de la torpeur ; à l'autopsie on constate des épanchements dans les plèvres, le péricarde et le péritoine, de la congestion du poumon et de l'intestin, etc.

Dès qu'une de ces septicémies apparaît dans une écurie, isoler les animaux malades et suspects et désinfecter l'écurie avec soin ; il serait même préférable, surtout quand on possède des animaux auxquels l'on tient particulièrement (expériences en train, vaccinations, etc.), de transporter immédiatement les animaux restés sains dans un autre local et de les placer dans des cages strictement désinfectées; encore sera-t-il souvent difficile, quoi qu'on puisse faire, d'arrêter la marche de l'épidémie.

C. — PRÉHENSION ET CONTENTION DES ANIMAUX.

La plupart des animaux se défendent quand on les saisit et usent de leurs dents et de leurs griffes contre l'agresseur ; il faut prendre certaines précautions pour se mettre à l'abri de ces blessures qui peuvent être dangereuses quand l'animal est atteint d'une maladie transmissible à l'homme, telle que la rage, par exemple. Un bon expérimentateur ne doit jamais être blessé par les animaux qu'il manie.

La *contention* peut être simplement *manuelle*, qu'elle soit pratiquée par l'opérateur lui-même ou par un aide; ce procédé suffit pour maintenir la plupart des animaux pendant les inoculations sous-cutanées; mais quand on pratique certaines inoculations délicates dans le péritoine, les méninges, les veines, etc., ou qu'on injecte un virus dangereux tel que celui de la morve ou de la rage, ou qu'on utilise des animaux farouches, on a recours à la *contention instrumentale*, pratiquée à l'aide d'appareils appropriés à chaque espèce animale. Nous indiquerons la conduite à tenir vis-à-vis des animaux les plus ordinairement utilisés. Dans le maniement des petits animaux on doit s'exercer à se passer d'aide autant que possible.

LAPIN.

Préhension. — Le lapin doit être saisi par la peau du dos ou par une seule oreille; ce sont les seuls procédés qui permettent de se mettre à l'abri de ses griffes.

Contention manuelle. — Le plus souvent l'opérateur se contente de placer l'animal sur ses genoux et de le maintenir avec la main gauche pendant que la droite pousse l'injection.

Si l'animal est peu docile, l'opérateur le saisit avec la main droite par la peau du dos et le place sous son bras gauche de façon que la tête et les pattes antérieures pendent en arrière dans le vide, le tronc étant maintenu par l'avant-bras et les pattes postérieures fixées par la main gauche; la main droite de l'opérateur devient alors libre et peut pousser l'injection.

Quand on dispose d'un aide, il saisira l'animal comme l'indique

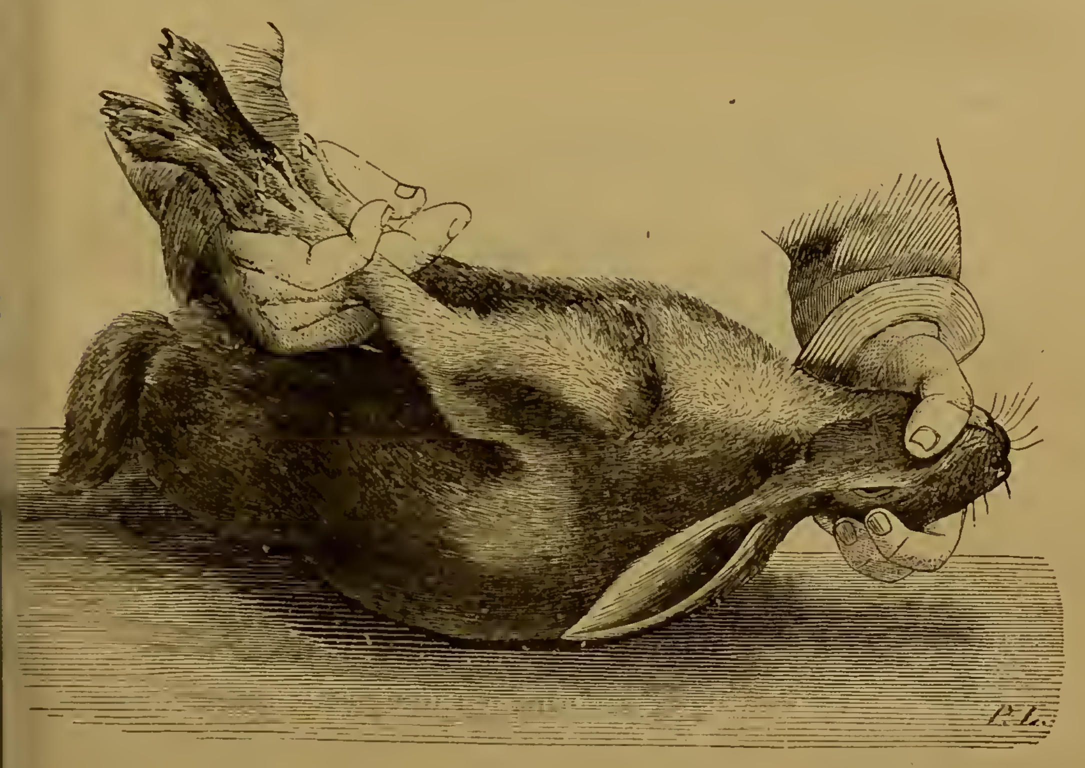


Fig. 98. — Contention simple du lapin par les deux mains d'un seul aide.

la figure 98, la main gauche maintenant les pattes et la droite la tête.

Contention instrumentale. — Le procédé le plus simple consiste à envelopper l'animal jusqu'au cou dans une serviette ou une large bande de toile en lui ramenant les pattes sous le corps. On peut ainsi opérer sur la tête, les oreilles, etc. Si on voulait pratiquer une inoculation sur une patte, on laisserait celle-ci hors de la serviette et on la maintiendrait en extension à l'aide de la main gauche.

Pour obtenir une immobilisation complète on a recours à divers appareils; nous citerons seulement ceux de Malassez, de Czermak (fig. 99) et de Latapie; ce dernier est applicable à la contention de tous les

petits animaux, il est fort ingénieux mais compliqué et d'un prix élevé.

L'appareil le plus simple et le plus recommandable consiste en

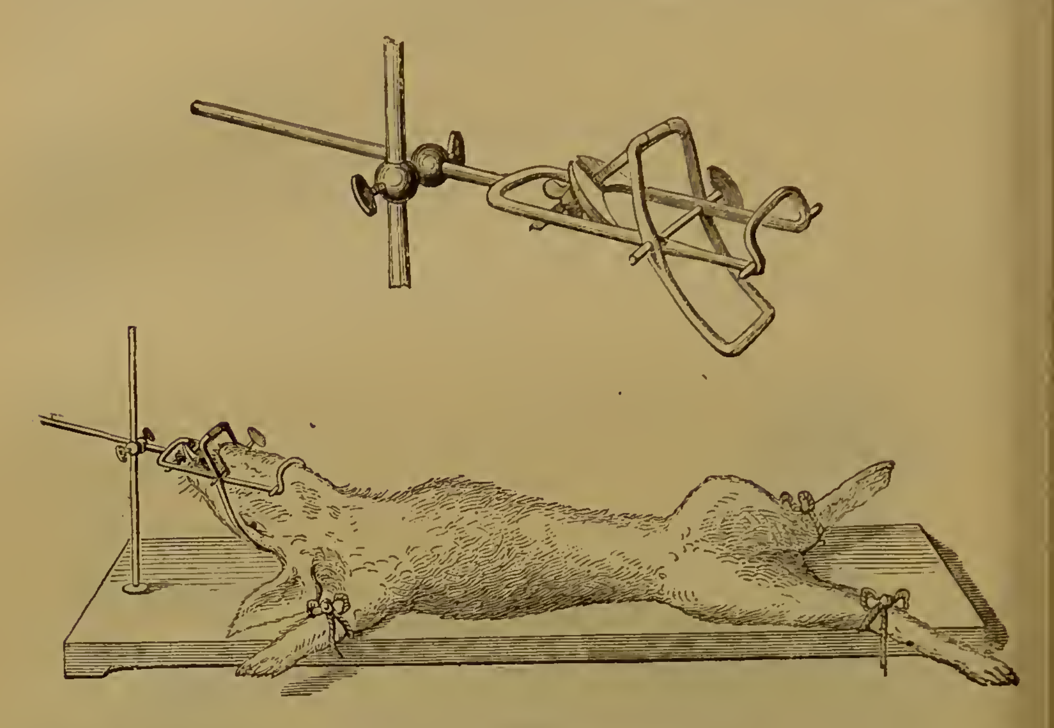


Fig. 99. — Appareil de Czermak.

un plateau rectangulaire en zinc, muni d'un léger rebord percé sur tout son pourtour de trous espacés de 2 à 3 centimètres.

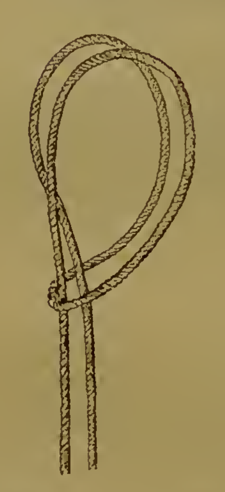


Fig. 100. — Préparation du nœud coulant pour fixer le lapin sur le plateau à vivisection.

Placer l'animal sur le plateau, engager un de ses membres inférieurs dans un nœud coulant (fig. 100) formé par une ficelle ou mieux un lacet de cuir, serrer au-dessus du carpe, passer un des chefs du lien dans un trou voisin d'une extrémité du plateau et le nouer avec l'autre chef. Lier de même le membre inférieur du côté opposé à un trou de l'autre extrémité du plateau. Terminer en fixant les deux membres restés libres. L'animal est parfaitement immobilisé; la tête peut être maintenue par un aide ou fixée avec une cordelette passant par la barre, en arrière des incisives, et dont les deux extrémités sont liées, en avant, dans deux des trous du plateau.

On peut encore maintenir la tête avec l'anneau de Ranvier; une tige de fer horizontale *a* se meut sur une tige verticale *b* à l'aide d'une double articulation qui permet de la fixer dans

toutes les positions; cette tige *a* est terminée par un anneau perpendiculaire à son axe; sur cet anneau peuvent se déplacer deux petits crochets à chaque extrémité desquels s'adapte un lien de caoutchouc. Pour l'usage, placer le museau de l'animal dans l'anneau, fixer le lien de caoutchouc à l'un des crochets, le faire passer derrière les oreilles et en attacher l'extrémité au second crochet.

L'appareil s'adapte sur le plateau à l'aide d'une coulisse et d'une vis à pression.

L'animal peut être placé à volonté sur le dos ou sur le ventre; la

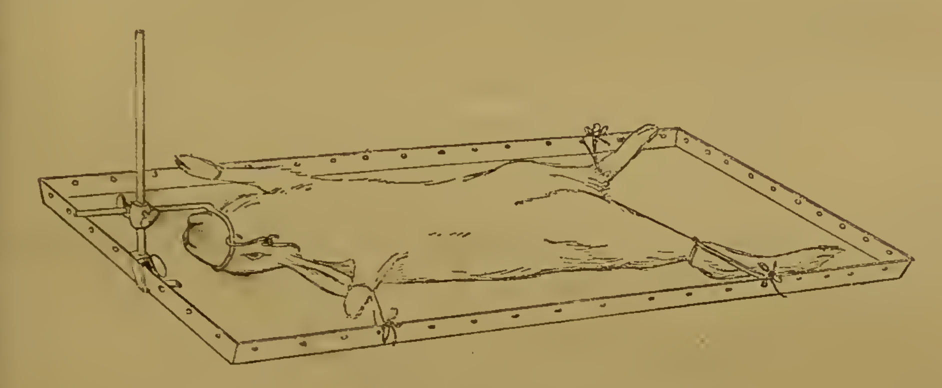


Fig. 101. — Plateau pour immobiliser le lapin.

figure 101 représente un lapin fixé sur le plateau et dont la tête est maintenue par l'appareil de Ranvier.

Anesthésie. — Le lapin est très sensible aux anesthésiques. Il faut se garder de lui administrer du chloroforme lentement, à petites doses, on le tuerait ainsi à peu près à coup sûr; au contraire, en lui donnant d'emblée une forte dose, mais en suspendant après quelques instants l'inhalation, on arrive à éviter presque complètement les accidents.

Faire un cornet avec un morceau de papier filtre, y verser une forte cuillerée à café de chloroforme et en coiffer le museau de l'animal. Au bout de quelques secondes, les mouvements respiratoires s'arrêtent, puis ils reparaissent bientôt : dès ce moment l'anesthésie est complète, suspendre l'administration du chloroforme et pratiquer rapidement l'opération.

COBAYE.

Préhension. — Le cobaye est plus aisé à manier que le lapin; on doit le saisir de préférence par la peau du dos.

Contention manuelle. — Elle suffit dans la plupart des cas; main-

tenir l'animal avec la main gauche pendant que la droite pousse l'injection.



Fig. 102. — Pince pour la contention des petits animaux.

Contention instrumentale. — Le procédé le plus simple consiste à saisir l'animal par la peau du dos avec une forte pince à pression dont les mors ont la forme d'anneaux (fig. 102); la pince étant fixée au cran d'arrêt, on passe l'œil d'une de ses branches sur un clou fiché dans le mur : l'animal ainsi suspendu dans le vide se trouve parfaitement immobilisé.

Pour les opérations délicates, fixer l'animal sur le plateau en zinc que nous avons décrit précédemment. Il est bon de posséder des plateaux de deux tailles, des grands pour les lapins, des petits pour les cobayes.

Anesthésie. — Le cobaye est moins sensible aux anesthésiques que le lapin, mais on a rarement l'occasion de le soumettre à l'action de ces agents. On opérerait comme pour la chloroformisation du lapin.

SOURIS BLANCHE ET RAT BLANC.

Préhension. — Ces animaux sont le plus souvent maniables et peuvent être saisis avec les doigts par la queue ; quelquefois ils se défendent et font des morsures assez douloureuses, on les prendrait alors par la queue ou par la peau de la nuque avec une pince à forcipressure.

Contention. — Le seul procédé recommandable consiste à saisir l'animal par la queue avec une pince ou avec les doigts ; attirer alors la queue hors du bocal, l'animal étant suspendu la tête en bas, et placer une planchette sur l'ouverture du bocal de façon à ne laisser passer que la queue et à se mettre à l'abri des morsures. On peut alors pratiquer l'inoculation à la base de la queue. Pour inoculer au niveau d'un membre postérieur, on ferait également sortir ce membre du bocal à l'aide d'une pince.

Anesthésie. — Pour toutes les opérations délicates il est préférable d'anesthésier l'animal. Les rats et les souris succombent facilement sous le chloroforme, mais supportent bien l'éther.

On introduit l'animal sous une cloche à côté d'un petit tampon d'ouate hydrophile imbibé d'éther. On pourrait aussi projeter directement le tampon dans le bocal où se trouve l'animal. Dès que le ra

ou la souris tombent, privés de mouvements, les retirer du flacon et les fixer sur une planchette ou un petit plateau; pour le rat, compléter au besoin la contention avec le mors de Ranvier pour rat. On peut prolonger l'anesthésie en faisant inhaler de temps en temps un peu d'éther.

RAT GRIS.

Préhension. — Le rat gris se défend énergiquement et fait de cruelles morsures; on ne peut le saisir qu'avec les pinces longues et fortes que nous avons décrites plus haut.

Introduire une pince dans le bocal où se trouve l'animal et le saisir rapidement, où l'on pourra. Aussitôt le rat se jette sur la pince et la mord; profiter de ce moment pour poser une seconde pince sur la peau de la nuque. Fixer solidement les deux pinces et sortir l'animal du bocal.

Contention. — Un aide tient l'animal avec les deux pinces, il incline le long de la colonne vertébrale la pince de la nuque, ramène la queue à côté de cette pince et la maintient de la même main. De l'autre main il maintient la deuxième pince sur laquelle il tire légèrement de façon à mettre l'animal dans l'impossibilité de se servir de ses dents; si cette deuxième prise était mauvaise, on placerait une autre pince sur la peau qui recouvre la mâchoire inférieure, par exemple. L'opérateur peut alors pratiquer l'inoculation en se tenant hors de l'atteinte des dents de l'animal. L'opération terminée, ne desserrer les pinces qu'après avoir reporté le rat dans son bocal.

Anesthésie. — Doit toujours être employée pour les inoculations difficiles ou dangereuses. Introduire dans le bocal où se trouve l'animal un tampon d'ouate imbibé d'éther et opérer comme nous l'avons dit à propos du rat blanc.

CHIEN.

Préhension. — Si le chien est docile, lui parler, le flatter puis le saisir solidement par la peau du cou.

En présence d'un chien hargneux, farouche, utiliser pour la préhension une *pince à collier*, longue pince en fer dont les mors forment en se réunissant un collier avec lequel on enserre le cou de l'animal. On peut encore employer le procédé de la *demi-strangulation*; on jette un nœud coulant autour du cou du chien et on serre le nœud en prenant un point d'appui sur un barreau de la cage, un poteau, etc.; l'animal tombe demi-asphyxié, on profite de ce qu'il est en résolution pour le museler et lui lier les pattes.

Musellement. — On ne doit jamais pratiquer une opération sur un chien sans l'avoir muselé.

Le procédé le plus simple consiste à passer une cordelette solide dans la gueule de l'animal en arrière des canines, à faire un nœud simple au-dessous du maxillaire inférieur, puis à ramener les deux chefs de la corde sur le museau où on les fixe solidement par un double nœud (fig. 103).

On peut encore placer dans la gueule, en arrière des canines, une tige de fer ronde,

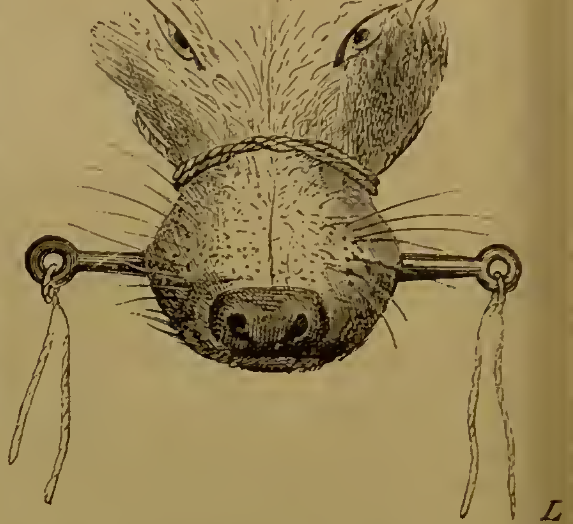


Fig. 103. — Musellement du chien ; procédé de la ficelle.

Fig. 104 — Musellement du chien avec une forte ficelle placée en arrière d'un mors de fer (Claude Bernard).

puis avec une cordelette faire deux tours sur le museau, en arrière du bâillon, serrer et nouer solidement (fig. 104).

Quand on se propose de faire le cathétérisme de l'œsophage pour injecter un produit directement dans l'estomac, il faut museler l'animal la gueule ouverte. On utilise dans ce cas le mors à double branche transversale de Claude Bernard ; la figure 105 indique, sans qu'il soit nécessaire d'insister, l'application de cet instrument.

Plus simplement, on peut remplacer ce mors par un bâillon rectangulaire en bois, de dimensions appropriées à la taille du chien et percé d'un trou à son centre. Après avoir placé ce bâillon dans la gueule, en arrière des canines, on fixe les deux mâchoires par le procédé de la cordelette.

Contention. — Le musellement, joint à la contention manuelle, suffit dans la plupart des cas ; pour les opérations longues il faut maintenir l'animal à l'aide de la gouttière de Cl. Bernard ou plus simplement en le fixant par les pattes, comme nous l'avons vu pour le lapin sur une table en bois épais, percée de trous ou munie de crochets pour le passage des liens (fig. 106 et 107).

ig. 105. — Disposition du mors à double branche transversale permettant de tenir ouverte la gueule de l'animal installé sur la gouttière brisée.

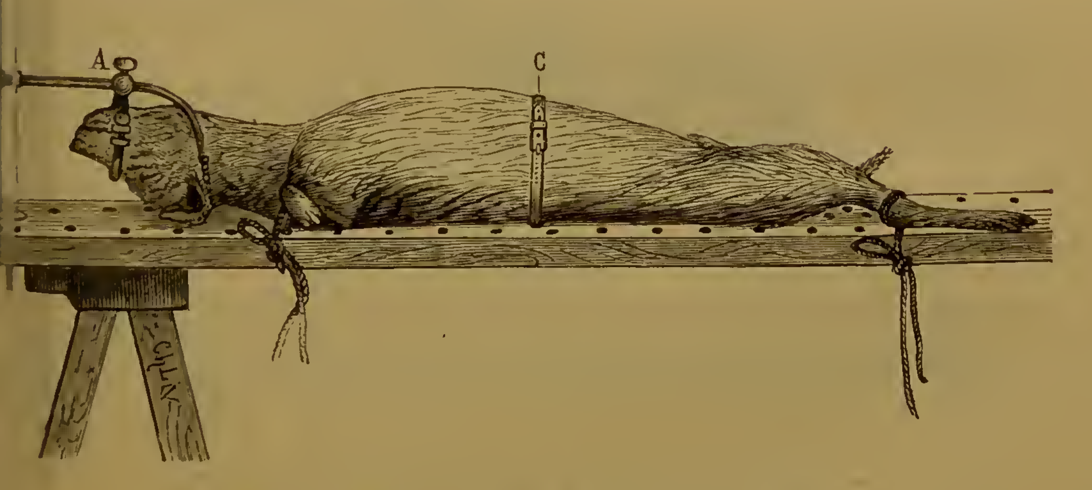


Fig. 106. — Chien fixé sur le dos sur la table à vivisection.

Anesthésie. — On a rarement occasion d'anesthésier le chien dans les opérations bactériologiques.

Le chien tolère bien le chloroforme, à la condition qu'on ne lui

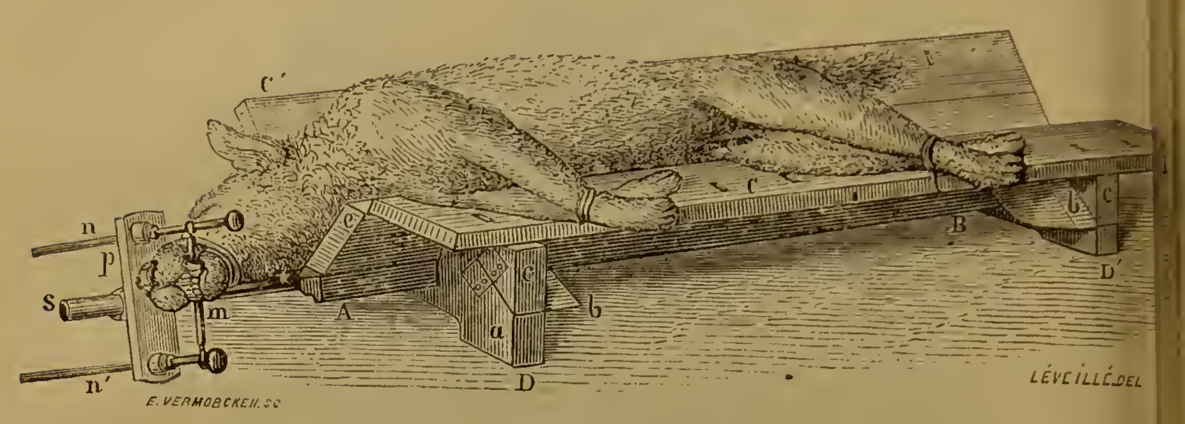


Fig. 107. — Gouttière brisée (Claude Bernard).

donne pas de doses massives et que le liquide ne vienne pas au contact de sa muqueuse nasale.

On utilise d'ordinaire pour pratiquer l'anesthésie une muselière allongée, terminée par une petite boîte grillée *a* dans laquelle on place une éponge imbibée de chloroforme. On suspend et on reprend

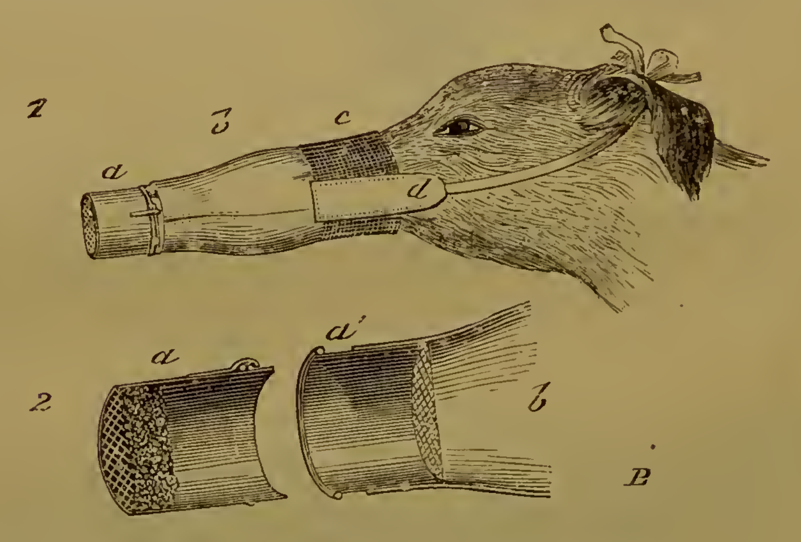


Fig. 108. — Muselière pour l'anesthésie du chien.

à volonté l'administration de l'anesthésique en enlevant ou en remplaçant cette boîte sur la muselière (fig. 108). Commencer par de petites doses; l'anesthésie est obtenue au bout de huit à quinze minutes.

CHAT.

Le chat est très difficile à manier; on a rarement l'occasion de l'utiliser.

Si l'animal se laisse prendre, le caresser et le saisir fortement par la peau du dos. Si le chat est farouche on sera forcé de recourir au procédé de la demi-strangulation.

Pour pratiquer l'opération, le mieux est d'anesthésier l'animal; pour cela, aussitôt qu'il est saisi, on le projette dans un bocal à large ouverture dans lequel on a placé une éponge imbibée de chloroforme et que l'on couvre immédiatement. Le chat est très sensible au chloroforme; il faut le retirer du bocal dès qu'il tombe; l'anesthésie persiste plusieurs minutes sans administration nouvelle de chloroforme. L'animal endormi peut être fixé sur la table à vivisections.

On peut encore envelopper le chat dans une longue pièce de toile en lui ramenant les pattes sous le ventre, puis plonger dans un sac la tête et la moitié antérieure du corps; ce procédé est excellent pour les inoculations sur le train postérieur, les injections rectales, etc.

SINGE.

Le singe est assez difficile à manier; on peut l'immobiliser comme le chien, mais il est préférable de le chloroformer si l'opération doit durer quelque temps.

CHEVAL ET ANE.

La plupart du temps le cheval peut être inoculé sans qu'on ait à employer de moyens spéciaux de contention, il suffit qu'un aide le maintienne par le bridon ou le licol; si le cheval est ombrageux, on lui couvre les yeux; s'il se défend, on emploie le tord-nez ou on fait maintenir un membre antérieur en flexion par un aide accoutumé à manier les chevaux. Pour les opérations plus longues on entrave et abat l'animal par les procédés usités en art vétérinaire.

BOVIDÉS.

La contention des bovidés est la plupart du temps aisée; pour les opérations longues on coucherait l'animal sur la table à inoculations vaccinales.

OISEAUX.

Les oiseaux de basse-cour ordinairement utilisés sont maintenus facilement avec la main ; on peut aussi les fixer par les pattes et les ailes sur le plateau en zinc décrit page 162.

Remarque. — Après chaque opération, les mors, bâillons, plateaux, etc., doivent être nettoyés avec soin et lavés avec une solution de crésyl ou d'acide phénique.

D. — INOCULATIONS.

I. — INSTRUMENTS POUR LES INOCULATIONS.

Nous n'insisterons pas sur les instruments, d'usage banal, qui servent à inciser la peau, à dénuder les vaisseaux. Il nous suffira de dire qu'avant chaque opération, les bistouris, ciseaux, pinces, écarteurs, aiguilles de Deschamps, aiguilles à suture, etc., doivent être plongés pendant environ dix minutes dans de l'eau portée à l'ébullition, puis être placés dans une solution phéniquée à 2 p. 100. Après l'opération, les instruments sont de nouveau nettoyés avec soin, puis passés à l'alcool et séchés avec un linge fin.

L'opérateur doit avoir à sa disposition de l'ouate hydrophile et du fil stérilisés.

Préparation du fil stérilisé. — On choisira de préférence du cordonnet fin de soie tressée.



Fig. 109. — Flacon pour conserver le fil stérilisé.

a). On peut stériliser le fil au moment même de s'en servir en le plongeant pendant environ 15 minutes dans de la solution phéniquée à 3 p. 100 portée à l'ébullition. Mais il est préférable de tenir une provision de fil prête d'avance en adoptant un des deux procédés suivants.

b). Couper le fil en aiguillées de 0m,30 environ ; préparer des petits paquets contenant chacun trois ou quatre aiguillées de fil et enveloppés dans deux ou trois doubles de papier filtre. Porter les paquets pendant quinze minutes à l'autoclave à 120°, puis les sécher à l'étuve et les conserver dans une boite ou un flacon bien fermés. Ouvrir les paquets un à un, au moment même du besoin. Tout paquet ouvert et non utilisé tout de suite doit être rejeté.

c). Dans un petit flacon placer le peloton de fil et quelques gouttes d'eau ; faire passer le bout du fil dans un tube de verre traversant le bouchon du flacon (fig. 109) et contenant un tampon d'ouate

serré. Le fil passe à frottement entre la paroi du tube et l'ouate. Stériliser le tout à l'autoclave. Au moment du besoin, il suffit de tirer sur le bout du fil pour dévider le peloton; avoir soin de toujours rejeter l'extrémité du fil qui émergeait du tube; le fil se conserve stérile dans le flacon.

On doit encore avoir à portée de la main des solutions antiseptiques (acide phénique à 2 p. 100, sublimé acide à 1 p. 1000) et de l'eau stérile.

Préparation de l'eau stérile. — Préparer d'avance des tubes à essai ou des flacons 50 à 100 grammes, aux trois quarts pleins d'eau et stérilisés à l'autoclave à 115°. Au moment du besoin, puiser dans le flacon à l'aide d'une pipette Pasteur. Tout flacon ou tube ouvert et non utilisé immédiatement doit être rejeté.

On pourrait encore stériliser l'eau dans des matras répartiteurs (fig. 25), mais il est préférable d'utiliser des récipients de petites dimensions, dont le contenu ne sert que pour une opération; on évite ainsi toute chance de souillure.

Préparer également d'avance des verres flambés, des agitateurs, des öses, des pipettes Pasteur.

Enfin il est indispensable de posséder des instruments spéciaux, destinés à porter le virus à l'intérieur des tissus, ce sont les *seringues* et *aiguilles* sur lesquelles nous devons insister.

SERINGUES A INOCULATIONS.

Il existe un grand nombre de modèles de seringues pour les inoculations; cette abondance même prouve combien il est difficile d'obtenir un instrument parfait possédant toutes les qualités requises. Ces qualités sont les suivantes :

1° La seringue doit pouvoir être stérilisée à l'eau bouillante ou à la vapeur sous pression.

2° Le piston et les joints doivent être parfaitement étanches et suffisamment résistants pour ne pas nécessiter des remplacements fréquents.

3° La seringue doit porter une graduation sur la tige du piston ou sur le corps en verre.

Seringue de Pravaz. — Le modèle le plus ancien et peut-être le meilleur au point de vue de l'étanchéité est la seringue de Pravaz, malheureusement les joints et le piston en cuir ne supportent pas la température de l'eau bouillante, ce qui fait rejeter l'usage de cette seringue. On pourrait l'utiliser à la rigueur, en la désinfectant par une immersion de plusieurs heures dans une solution phéniquée à 5 p. 100, suivie d'un rinçage à l'eau stérile.

Pipette Pasteur. — L'instrument le plus simple consiste en une pipette Pasteur à effilure courte, pointue et légèrement courbe (fig. 110) ; on aspire le liquide à inoculer dans la pipette ; on traverse la peau avec la pointe effilée et on détermine la pénétration du liquide dans les tissus en soufflant par l'extrémité fermée à l'ouate. Cet appareil peut suffire dans un grand nombre de cas.



Fig. 110. — Pipette Pasteur disposée pour pratiquer les inoculations.

Seringues à piston d'air. — Koch, Petri, etc., ont supprimé le piston ; le cylindre de verre qui constitue le corps de la seringue porte à une de ses extrémités l'aiguille et à l'autre une poire en caoutchouc. En comprimant la poire on détermine la pénétration du liquide, mais, quand le tissu dans lequel on injecte est à trame serrée, le liquide ne pénètre pas ou reflue dès qu'on enlève la seringue. Ces instruments sont à rejeter.

Seringue de Straus. — Straus remplace dans la seringue de Pravaz le cuir du piston par de la moelle de sureau comprimée, et obtient un instrument supportant très bien les températures de l'eau bouillante et de l'autoclave.

On peut remplacer le piston aussi souvent qu'il est nécessaire ; cette manœuvre facile est cependant un peu longue ; d'ailleurs ce remplacement s'impose souvent, car la moelle de sureau perd rapidement son élasticité. Avec cette réserve c'est là un bon appareil.

Remplacement du piston. — Prendre un morceau de moelle de sureau à grain fin et régulier, enlever avec un bistouri sa couche fibreuse externe, le comprimer avec les doigts dans son sens longitudinal de manière à l'aplatir autant qu'il est possible, puis y découper un petit cylindre entrant à frottement très dur dans le corps de la seringue, le perforer au centre avec une aiguille rougie dans la flamme et le fixer sur l'extrémité de la tige du piston. Avec une lime très fine polir les faces latérales de ce cylindre et l'introduire dans le corps de la seringue. Une immersion de quelques instants dans l'eau gonfle la moelle de sureau et rend le piston étanche, on peut d'ailleurs le comprimer à volonté à l'aide de la vis moletée qui termine la tige en dehors de la seringue.

Roux a modifié cette seringue ; dans le modèle qu'il recommande le corps est constitué par un cylindre de verre dont l'extrémité inférieure est étirée et rodée pour recevoir l'aiguille sans intermédiaire d'aucune sorte ; le piston peut entrer et sortir librement du tube, celui-ci ne portant à sa partie supérieure, en guise de douille, qu'un simple bouchon.

Seringues de Malassez. — Il en existe plusieurs modèles ; les seuls recommandables sont ceux dont le piston est constitué par un mélange de caoutchouc et d'amiante ou par de la *fibre*, substance composée de cellulose et de caoutchouc. La partie inférieure du corps de la seringue est étirée et rodée et s'adapte à l'aiguille par l'intermédiaire d'une garniture en fibre.

Seringue de Felizet. — C'est une seringue de Pravaz dans laquelle le piston est constitué par un anneau de caoutchouc maintenu entre deux plateaux métalliques, la tige du piston étant munie d'un écrou permettant de serrer cet anneau à volonté. L'aiguille est fixée sur la douille de la seringue, non à frottement, mais au moyen d'un pas de vis très allongé, de telle sorte qu'un seul tour assure la fixation. Cet instrument est très défectueux ; le piston grippe, s'altère facilement, le joint de l'aiguille n'est pas étanche.

Seringue à piston métallique. — Récemment on a essayé de remplacer les pistons élastiques par des pistons rigides constitués par des tiges métalliques exactement calibrées ; le seul modèle de ces instruments que nous ayons eu entre les mains était très peu satisfaisant et laissait refluer le liquide entre le cylindre et le piston.

Seringue de Roux. — Roux a fait construire pour les inoculations sérothérapiques une seringue de contenance de 20 centimètres cubes, dont le piston est constitué par une préparation à base de caoutchouc. L'aiguille est réunie à la douille par un tube de caoutchouc long de 10 centimètres environ ; cette disposition permet de pousser l'injection sans risquer de déplacer l'aiguille. Pour stériliser la seringue, avoir soin de desserrer d'abord la douille supérieure pour donner du jeu au cylindre de verre qui constitue le corps de la seringue et éviter qu'il n'éclate par la dilatation.

Seringue de Debove. — La seringue de Debove (fig. 111) est la meilleure à notre avis ; très maniable, facilement stérilisable, solide et d'une étanchéité parfaite, elle convient pour toutes les inoculations.

Elle est constituée par un tube en cristal, gradué en centimètres cubes, exactement calibré intérieurement et fixé entre deux douilles métalliques garnies de rondelles d'amiante par une armature métallique mobile, complètement indépendante et que commande un levier C.

La douille inférieure présente un prolongement conique, destiné à recevoir directement l'aiguille ou à monter un intermédiaire en caoutchouc entre la seringue et l'aiguille.

Le piston P est constitué par des rondelles d'amiante comprises entre deux plaques métalliques ; la tige porte un bouton moleté, V,

qui permet de faire varier la compression des rondelles de manière à règler le jeu du piston.

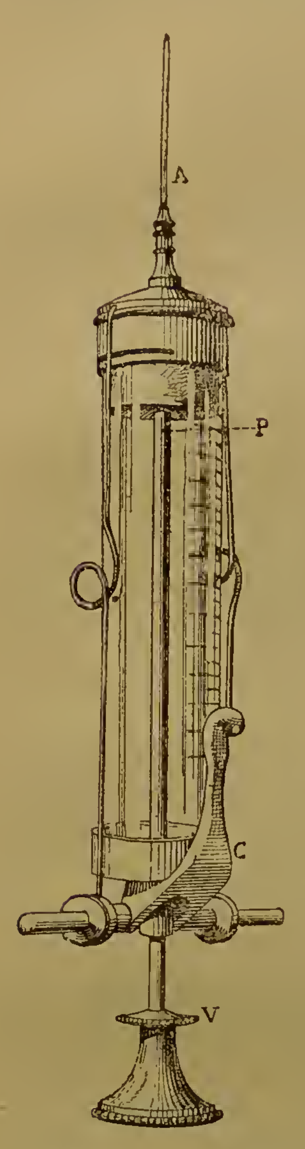


Fig. 111. — Seringue de Debove.

On démonte facilement la seringue en élevant le levier C; les tiges latérales de l'armature se trouvant alors relâchées, on peut dégager celle-ci et enlever les douilles.

Toutes les pièces de l'instrument sont interchangeables, ce qui supprime l'envoi au constructeur pour les réparations. La seringue se construit en plusieurs tailles de 2 à 100 centimètres cubes; les modèles de 2, 10 et 20 gr. sont les plus ordinairement utilisés.

Stérilisation de la seringue. — Amener le piston au bas de sa course; élever le levier C, de manière à relâcher le ressort et à permettre la dilatation du cylindre de cristal. Placer la seringue et l'aiguille dans un vase contenant de l'eau; porter à l'ébullition pendant quinze à vingt minutes; laisser refroidir, sortir la seringue de l'eau avec une pince flambée, faire écouler l'eau restée au-dessus du piston, abaisser le levier; adapter l'aiguille sur la douille.

L'inoculation faite, rincer la seringue à l'eau froide pour enlever toute trace de matières albuminoïdes que l'ébullition coagulerait, puis faire bouillir l'instrument dans l'eau qui a servi au rinçage : on stérilise du même coup cette eau et la seringue.

La stérilisation peut être effectuée à l'autoclave : on disposera la seringue comme nous venons de le dire et on la portera quinze minutes dans la vapeur sous pression.

Dans la plupart des cas, l'ébullition suffit pour assurer la stérilisation ; on aura recours à l'autoclave quand la seringue aura servi à inoculer des cultures de bactéries à spores résistantes (bacille du tétanos, vibrion septique, etc.).

Appareil pour injections massives. — Dans l'immunisation par les toxines, quand il faut injecter dans l'organisme de grandes quantités de cultures filtrées, la seringue n'est plus suffisante et ne permet pas de procéder avec la lenteur nécessaire. On adopte alors le dispositif suivant.

Un flacon de forme haute, portant une graduation gravée sur

le verre, de haut en bas, reçoit le liquide à injecter; son bouchon est traversé par deux tubes de verre dont un plonge jusqu'au fond; ce tube se continue par un tuyau de caoutchouc portant l'aiguille; le second tube, s'arrêtant au-dessous du bouchon et muni d'un tampon d'ouate sert à comprimer l'air dans le flacon; on obtient ainsi par l'aiguille un écoulement dont on peut régler la rapidité à volonté.

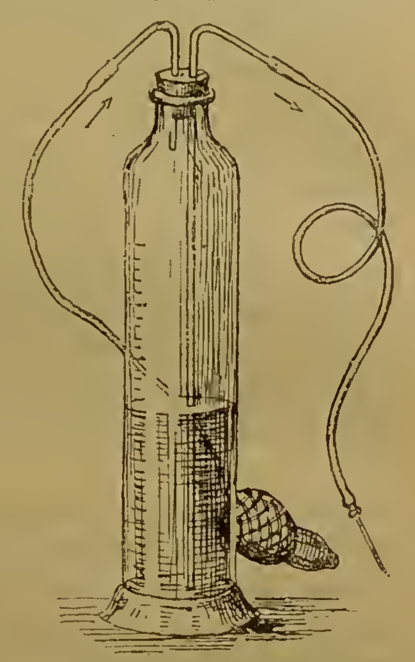


Fig. 112. — Appareil pour injecter de grandes quantités de liquide.

L'appareil doit d'abord être stérilisé à l'autoclave, à l'exclusion de la poire en caoutchouc, bien entendu; puis on y aspire le liquide à inoculer.

AIGUILLES.

On utilise d'ordinaire des aiguilles d'acier; elles ont l'inconvénient de se rouiller et de s'obstruer rapidement quand elles ont été mouillées, ce qu'on empêche facilement en les lavant avec soin après l'usage et en les conservant, après ébullition, dans un petit flacon plein d'alcool absolu ou d'une solution de borate de soude à 3 p. 100.

On a proposé de remplacer les aiguilles d'acier par des aiguilles en platine iridié, qui sont inoxydables et peuvent être chauffées au rouge, mais ces aiguilles sont d'un prix élevé, sont souvent fragiles, et de plus, le peu de résistance du platine force à donner un diamètre fort restreint à leur lumière; pour ces raisons, nous préférons les aiguilles d'acier qu'avec un peu de soin on conserve aisément en bon état. Il est nécessaire de posséder des aiguilles de différents calibres et de différentes longueurs.

II. — PRÉPARATION DES MATÉRIAUX D'INOCULATION.

Les substances à inoculer peuvent être solides ou liquides; la conduite à tenir varie dans chacun de ces deux cas.

A. — SUBSTANCES LIQUIDES.

Les substances liquides le plus fréquemment utilisées sont les cultures en bouillon; on inocule encore du sang, du sérum, des sérosités pleurale, péritonéale, etc.

Toute culture avant d'être inoculée doit être examinée au microscope, afin que l'on acquière la certitude de sa pureté.

Prélever avec les précautions d'usage une petite quantité de la culture dans une pipette Pasteur, la verser dans un verre flambé (fig. 1), puis l'aspirer dans la seringue stérilisée et munie de son aiguille; pour cela, on introduit l'aiguille dans le verre, soit en soulevant un peu le papier qui recouvre celui-ci, soit en traversant ce papier avec l'aiguille. Chasser l'air qui a pu s'introduire dans la seringue, en poussant légèrement le piston après avoir redressé l'instrument : avoir soin de tenir à côté de l'aiguille le papier stérile qui recouvrait le verre où l'on a puisé, les gouttelettes de culture sont ainsi recueillies par le papier à la sortie de l'aiguille. Avoir soin de brûler ce papier et de stériliser le verre par immersion dans l'eau bouillante.

Pour le sang, les sérosités diverses, après les avoir recueillis comme il sera dit aux chapitres XI et XII, les verser à l'aide de la pipette dans un verre flambé, puis opérer comme ci-dessus. Il est très difficile d'injecter directement du sang, ce liquide se coagulant rapidement et obstruant l'aiguille; si le virus se rencontre de préférence dans le sérum, on laissera la coagulation se produire, puis on aspirera et injectera le sérum. Au contraire, le virus est-il retenu par les caillots, on traitera ceux-ci comme nous le dirons pour les pulpes d'organes.

B. — SUBSTANCES SOLIDES.

Les substances solides, telles que fragments d'organes, échardes, etc., peuvent être insérées directement dans les tissus de l'animal : après avoir fait une petite incision, décoller le tissu cellulaire à l'aide d'un stylet, et dans la pochette ainsi formée introduire le fragment de substance, suturer ou obturer la plaie avec du collodion; on pourrait inoculer de même dans le péritoine, les muscles, etc.

De même, après avoir chargé une öse de microbes en grattant la surface d'une culture sur milieu solide, on peut introduire cette öse dans les tissus après avoir pratiqué une petite incision de la peau.

Mais, dans la majorité des cas, on prépare une émulsion avec la substance à inoculer et un peu d'eau ou de bouillon stérile, de manière à pouvoir pratiquer l'inoculation au moyen de la seringue.

a). **Cultures sur milieux solides.** — Racler la surface de la culture avec une öse forte, porter l'öse dans un verre flambé contenant un peu d'eau stérilisée et y délayer avec soin la culture de manière à obtenir une émulsion bien homogène. Si la culture était dure, ne

e mélangeait pas à l'eau, on la broierait comme il sera dit en *c*.

b). **Pus.** — Le pus est d'ordinaire trop épais pour pouvoir être njecté en nature ; en verser quelques gouttes avec une pipette dans in verre stérile, ajouter quelques gouttes d'eau ou de bouillon stérilisés, et mélanger intimement avec l'extrémité de la pipette.

c). **Pulpes d'organes.** — On recueille de la pulpe des organes ou de etits fragments de viscères, centres nerveux, etc. (Voy. chap. XII).

La substance recueillie est portée dans un verre stérile ; avec un gitateur flambé (1) on broie cette substance dans le fond du verre n communiquant des mouvements de rotation à l'agitateur maintenu entre le pouce et l'index de la main droite. Quand on a obtenu ne pâte homogène, on ajoute goutte à goutte, avec une pipette, un eu d'eau stérilisée et l'on continue à mélanger jusqu'à ce que émulsion soit fluide et bien homogène.

Il est souvent nécessaire, pour éviter la présence de grumeaux, et urtout quand on doit pratiquer l'injection dans une veine (danger e l'embolie), de filtrer l'émulsion sur un petit morceau de linge fin réalablement stérilisé.

III. — OPÉRATION.

Règle générale. — Avant de pratiquer une inoculation, il faut ouper les poils, puis désinfecter la région.

Les poils peuvent être coupés très courts avec les ciseaux courbes, u mieux rasés ; pour les opérations délicates, il est préférable de ratiquer l'épilation à l'aide d'une des pâtes suivantes.

I. Chaux récemment éteinte et décarbonatée	2	parties.
Eau	3	—

Faire passer jusqu'à saturation un courant d'hydrogène sulfuré ans ce lait de chaux en agitant fréquemment. Pour l'usage, appliuer la pâte obtenue sur la partie à épiler, laisser quelques minutes n contact et enlever avec de l'eau et une brosse à ongles.

II. Sulfure de sodium	3	parties.
Chaux vive pulvérisée	10	—
Amidon	10	—

Mélanger. Au moment de l'emploi, délayer un peu de la poudre vec de l'eau de façon à obtenir une pâte molle et l'appliquer sur la eau ; au bout de 3 à 4 minutes l'épilation est produite.

Dans un grand nombre de cas, après avoir coupé les poils, il uffira, pour aseptiser la peau, de la frotter avec un tampon d'ouate mbibé de solution de sublimé à 1 p. 1000 ou de solution phéniquée

(1) La surface et les angles de section de l'agitateur ne doivent pas avoir été émoussés, fin que le broiement soit plus efficace.

à 5 p. 100; pour obtenir une désinfection plus rigoureuse, il faut commencer par laver la peau avec de l'alcoolé de savon et une brosse, puis faire agir la solution antiseptique et essuyer à l'aide d'un papier stérile.

I. — INOCULATION ENDERMIQUE.

1° Raser et désinfecter la région ;

2° Pratiquer avec le bistouri des scarifications très superficielles, ou enlever l'épiderme en raclant avec la lame du bistouri la peau fixée entre deux doigts ;

3° Avec un agitateur flambé ou un peu d'ouate stérile fixée sur une pince à forcipressure, porter le virus sur la partie ainsi préparée, l'étendre et le faire pénétrer par friction.

Dans quelques cas, il suffira de frotter énergiquement la peau, avec un tampon imbibé de virus, sans scarifications ni grattage préalables.

En règle, pratiquer l'inoculation sur une région du corps que l'animal ne puisse atteindre (face dorsale des oreilles, peau du dos, etc.). Ce mode d'inoculation peut être pratiqué sur les différentes espèces animales.

II. — INOCULATION SOUS-CUTANÉE.

a). **Substances liquides.** — 1° Raser et aseptiser la région ;

2° Faire un pli en saisissant la peau entre le pouce et l'index de la main gauche ; enfoncer l'aiguille à la base de ce pli, pousser l'injection, retirer l'aiguille et s'assurer que le liquide ne reflue pas par le trou de la piqûre.

b). **Substances solides.** — 1° Raser et aseptiser la région ;

2° Pratiquer une petite incision cutanée avec le bistouri ; à l'aide de la sonde cannelée, décoller le tissu cellulaire sur une étendue suffisante, et dans la logette ainsi obtenue, introduire avec une pince flambée l'objet à inoculer ;

3° Placer sur l'incision un ou deux points de suture ou recouvrir la plaie avec un peu de collodion.

L'injection doit être pratiquée de préférence sur un point que l'animal ne puisse atteindre, dans le tissu cellulaire de la base de la queue, ou sous la peau du dos ou des oreilles, par exemple ; souvent, cependant, on inocule sous la peau de l'abdomen ou de la cuisse.

Pour les inoculations de substances solides, choisir un endroit où la peau soit très lâche : les flancs, l'aine, par exemple.

III. — INOCULATION INTRA MUSCULAIRE.

1° Raser et aseptiser la région;

2° Enfoncer profondément l'aiguille dans les masses musculaires; pousser l'injection; retirer l'aiguille.

Chez les mammifères, on inocule de préférence dans les masses musculaires de la cuisse, chez les oiseaux dans les pectoraux.

IV. — INOCULATION INTRA VEINEUSE.

Autant que possible ces injections doivent être pratiquées sur une veine superficielle que l'on n'aura pas besoin de dénuder et qu'il suffira de piquer avec l'aiguille à travers la peau.

Ce mode d'inoculation n'est pas praticable chez les petits animaux, tels que la souris.

a). **Lapin.** — 1° Choisir de préférence une veine dorsale de l'oreille et particulièrement la veine marginale externe; ne pas s'adresser aux veines médianes, qui, étant immergées dans un tissu cellulaire lâche, fuient sous l'aiguille;

2° Au niveau de la veine, couper les poils avec les ciseaux courbes et aseptiser la peau. Le lapin est placé sur les genoux de l'opérateur et maintenu, s'il est nécessaire, par un aide;

3° Saisir le bord de l'oreille entre l'index et le pouce de la main

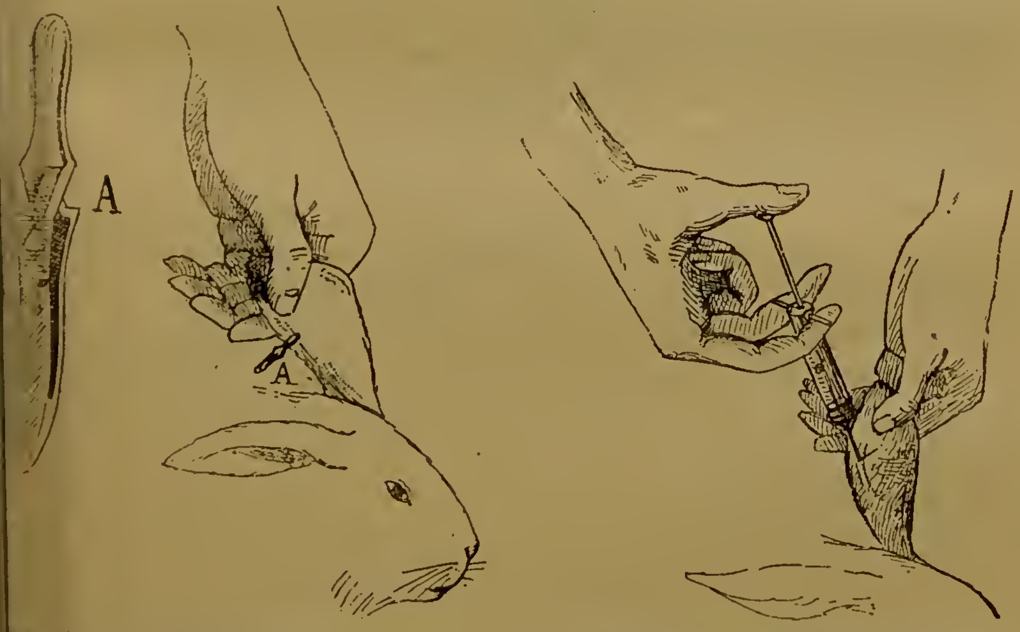


Fig. 113. — Injection dans la veine auriculaire du lapin (premier temps).

Fig. 114. — Injection dans la veine auriculaire du lapin (deuxième temps).

gauche, de manière à le tendre; placer une pince à pression à la base de l'oreille pour faire saillir la veine (fig. 113); frotter la peau

avec un tampon imbibé de solution phéniquée ; la veine devient turgescente ;

4° Avec l'aiguille maintenue dans une position très oblique, presque parallèle à la direction de la veine, piquer la paroi veineuse en se dirigeant vers la racine de l'oreille (fig. 114) ;

5° Quand l'aiguille a pénétré dans la veine, enlever la pince (il est bon de replacer cette pince plus haut, sur l'aiguille elle-même, de manière à bien fixer l'aiguille dans le vaisseau), et pousser lentement l'injection.

Si l'aiguille n'avait pas pénétré dans la veine, il se formerait une boule d'œdème dans le tissu cellulaire et il faudrait recommencer plus bas l'opération.

L'injection poussée, retirer l'aiguille ; si la piqûre saigne, maintenir la pince pendant quelques minutes sur la petite plaie.

b). **Chien.** — Pratiquer l'inoculation dans la veine externe du membre postérieur (petite saphène).

1° Museler l'animal, le faire maintenir par un aide ;

2° Couper les poils de la partie externe de la patte, au niveau du point où les muscles du mollet se continuent avec le tendon d'Achille. Faire comprimer la racine du membre, frotter la région avec un tampon imbibé d'eau phéniquée ; on voit saillir la petite saphène ; elle est facilement abordable à la partie supérieure du tendon d'Achille ;

3° Autant que possible, éviter de découvrir la veine par incision de la peau et pratiquer l'inoculation en traversant du même coup, avec l'aiguille, la peau et la paroi du vaisseau.

Pour le reste, opérer comme d'ordinaire.

c). **Cheval.** — Rechercher et faire saillir la jugulaire comme il a été dit page 48. Pratiquer l'injection selon les règles ordinaires.

d). **Oiseaux.** — Inoculer dans la veine axillaire.

1° L'animal étant fixé, un aide maintient l'aile étendue et en comprime la base. Arracher le duvet qui couvre la peau de la face interne de la racine du membre ; frotter avec un tampon imbibé de solution phéniquée ;

2° La veine étant devenue turgescente, y pratiquer l'injection.

V. — INOCULATION ARTÉRIELLE.

Cette inoculation se pratique, chez les mammifères, dans la fémorale ou la carotide.

a). **Fémorale.** — La fémorale occupe chez les animaux la même position que chez l'homme : au niveau du pli de l'aine, la veine est

en dedans, puis vient l'artère et enfin, en dehors, le nerf crural. L'artère suit une ligne allant du milieu du pli de l'aine au côté interne du genou.

1° Fixer l'animal sur le dos, écarter et étendre le membre postérieur; raser et désinfecter la région;

2° Après avoir constaté les battements artériels vers le milieu du pli de l'aine, sur la ligne de direction du vaisseau, inciser la peau



Fig. 115. — Pli de l'aine chez le chien.

et le tissu cellulaire sur une longueur de quelques centimètres;

3° Sectionner sur la sonde l'aponévrose : on aperçoit alors le paquet vasculo-nerveux;

4° Reconnaître l'artère, traverser très obliquement sa paroi avec l'aiguille, pousser l'injection, retirer l'aiguille;

5° Suturer et collodionner la peau.

b). **Carotide.** — A la partie moyenne du cou, la carotide, chez tous les mammifères, se trouve appliquée le long de la trachée dans une gaine qui lui est commune avec la veine jugulaire profonde, le pneumogastrique et le grand sympathique.

1° L'animal étant couché sur le dos, la tête portée en extension, couper les poils et désinfecter la peau au niveau de la partie médiane du cou ;

2° Sur la ligne médiane, au-devant de la trachée, pratiquer une incision longitudinale sur une étendue de quelques centimètres ; sectionner d'abord la peau ;

3° Couper sur la sonde cannelée l'aponévrose qui réunit les deux sterno-mastoïdiens ;

4° Décoller au long de la trachée le tissu cellulaire en s'aidant du bec de la sonde ; écarter en dehors le sterno-mastoïdien : on aperçoit le paquet vasculo-nerveux ;

5° Avec une pince et la sonde, ouvrir la gaine du paquet vasculo-nerveux, reconnaître l'artère, plus volumineuse que la veine. Pratiquer l'injection comme il a été dit plus haut.

VI. — INOCULATION INTRA PÉRITONÉALE.

A. **Substances liquides.** — Toutes les précautions possibles doivent être prises pour ne pas perforer l'intestin.

1° Fixer solidement l'animal sur le dos ; raser et désinfecter quelques centimètres carrés de la peau de l'abdomen ;

2° Pincer la paroi abdominale entre le pouce et l'index de la main gauche de façon à obtenir un pli comprenant la peau et les muscles ;

3° Enfoncer l'aiguille de la seringue à la base du pli de manière à ce que la pointe fasse saillie au dehors, au côté opposé ; ramener alors l'aiguille en arrière pour amener la pointe dans la cavité abdominale et pousser l'injection. Retirer ensuite l'aiguille.

On peut encore adopter le procédé suivant qui donne une sécurité plus grande ; on utilise une aiguille recourbée qui n'est creuse que dans sa première moitié et dont le trou est situé à la partie la plus déclive de l'arc (fig. 116). On traverse avec cette aiguille la base du pli de la paroi abdominale ; la pointe faisant saillie au dehors, le trou se trouve dans la cavité péritonéale ; on pousse alors l'injection. La pointe de l'aiguille, restant au dehors pendant toute la durée de l'injection, ne peut blesser l'intestin.



Fig. 116. — Aiguille pour inoculation dans le péritoine.

B. **Substances solides.** — 1° L'animal est fixé sur le dos, la peau ·asée et désinfectée ;

2° Pratiquer sur la ligne blanche une incision de la peau, incision lont la longueur varie avec la taille du corps à inoculer;

3° Couper l'aponévrose au niveau de la ligne blanche en s'aidant le la sonde cannelée pour ne pas léser l'intestin ;

4° Saisir chaque lèvre de l'aponévrose avec une pince à forcipres-ure et l'attirer en haut autant que possible pour s'opposer à la ıernie de l'intestin ; introduire dans la plaie le corps à inoculer et e faire pénétrer dans la cavité péritonéale et l'engageant latérale-nent sous la paroi musculaire ;

5° Suturer l'aponévrose à la soie, puis suturer la peau et recouvrir a plaie avec du collodion.

La plus grande asepsie est nécessaire dans la pratique des inocu-ations intra péritonéales ; ces inoculations doivent toujours être aites avec un produit pur ; si l'on injectait dans le péritoine des cra-hats, matières fécales, etc., l'animal succomberait rapidement à une éritonite banale.

VII. — INOCULATION DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL.

A. **Substances liquides.** — 1° Fixer l'animal sur le ventre, la tête tant immobilisée par un aide ou avec un mors. Il est bon d'anes-nésier l'œil en y instillant quelques gouttes d'une solution de ocaïne à 1/50 ; cette solution doit rester environ dix minutes en ontact avec l'œil pour que l'anesthésie soit complète ;

2° Écarter les paupières et fixer l'œil avec le pouce et l'index de la ıain gauche ; enfoncer l'aiguille, perpendiculairement à l'axe de œil, sur le bord de la cornée, au point où celle-ci rejoint la scléro-que. Injecter quelques gouttes ; retirer l'aiguille.

B. **Substances solides.** — 1° Comme en A ;

2° Les paupières étant écartées et l'œil fixé, avec un très fin scalpel ou n couteau à cataracte ou un couteau lancéolaire coudé, pratiquer une ıcision de quelques millimètres sur le bord supérieur de la cornée ;

3° Faire pénétrer à travers l'incision le fragment de matière à ıoculer tenu à l'aide d'une pince fine coudée ; engager le fragment : plus possible dans la chambre antérieure par une friction légère ratiquée sur la cornée avec la curette de Daviel ou l'extrémité ıousse d'un stylet.

Les inoculations dans la chambre antérieure se pratiquent ordinai-ement chez le lapin ; elles sont employées principalement pour con-

férer la rage, étudier l'évolution de la tuberculose ou les phénomènes de la phagocytose.

VIII. — INOCULATION DANS LES VOIES RESPIRATOIRES.

A. **Inoculation dans le poumon.** — 1° Raser et désinfecter la peau du thorax au voisinage du creux de l'aisselle;

2° Au niveau d'un des premiers espaces intercostaux, enfoncer perpendiculairement (sur une longueur de un à plusieurs centimètres suivant la taille de l'animal), l'aiguille de la seringue ; pousser l'injection ; retirer l'aiguille.

B. **Inoculation intra trachéale** (*mammifères*). — 1° Fixer l'animal sur le dos, la tête maintenue en extension, le cou soulevé par un tampon d'ouate serré, un gros bouchon, un petit billot, etc. Sur la partie médiane du cou, au-dessous du larynx, raser et désinfecter la peau;

2° Sur la ligne médiane du cou, au-devant de la trachée, inciser la peau sur une longueur de 2 ou 3 centimètres;

3° Inciser l'aponévrose sur la sonde cannelée ;

4° La trachée étant mise à nu, y pénétrer obliquement de haut en bas entre deux anneaux avec l'aiguille de la seringue et pousser l'injection.

Remarque. — *a*). Chez les petits animaux, il est commode, aussitôt la trachée mise à nu, de la fixer en la traversant de part en part avec un fil monté sur une aiguille à suture.

b). Si l'on veut éviter tout risque d'inoculation dans le tissu cellulaire ou dans la paroi même de la trachée, prendre les précautions suivantes : se procurer un petit trocart très fin, muni d'une canule qui doit être plus courte que l'aiguille de la seringue ; la trachée découverte, faire pénétrer le trocart entre deux anneaux, retirer le mandrin en laissant en place la canule ; enfoncer l'aiguille de la seringue dans la canule de manière que la pointe de l'aiguille dépasse l'extrémité de la canule et pousser l'injection ; retirer l'aiguille d'abord, puis la canule.

5° Suturer la peau ; recouvrir la plaie avec du collodion.

C. **Inoculation intra-trachéale** (*oiseaux*). — L'ouverture de la trachée se trouve en arrière de la base de la langue :

1° Ouvrir le bec, attirer en avant la langue avec une pince ;

2° L'ouverture de la trachée apparait en arrière de la langue, y injecter directement le liquide à inoculer.

D. **Inhalations, pulvérisations.** — 1° Placer l'animal dans une cage métallique à paroi pleine, portant sur un des côtés une vitre permettant l'observation et munie sur une autre face de deux trous garnis d'un tampon d'ouate peu serré pour permettre le renouvellement de l'air; par un troisième trou on fait pénétrer le tube du pulvérisateur.

2° On peut pulvériser la culture liquide à l'aide de l'appareil de Richardson, mais quand le virus est susceptible de supporter la dessiccation sans perdre de son activité, il est préférable de verser la culture liquide sur des spores de vesses de loup, de la poudre de lycopode, ou du charbon de bois réduit en poussière impalpable ; on mélange intimement, puis on dessèche dans la cloche à vide au-dessus de chlorure de calcium ou d'acide sulfurique concentré. La poudre, bien sèche, est ensuite pulvérisée dans la cage à l'aide d'un soufflet.

Remarque. — Quand il opère avec des microbes pathogènes pour l'homme, l'expérimentateur doit se mettre à l'abri des poussières ; l'opération devra se faire de préférence en plein air.

IX. — INOCULATION INTRA CRANIENNE.

Se pratique d'ordinaire chez le lapin ou le cobaye :

1° Fixer l'animal sur le ventre, un aide maintenant solidement la tête ; on peut anesthésier l'animal, mais cette précaution n'est pas indispensable;

2° Couper les poils et désinfecter la peau de la tête, en arrière des orbites ;

3° A partir de la ligne qui rejoint le bord supérieur des deux orbites, sur la ligne médiane, pratiquer une incision de 3 centimètres environ, intéressant la peau et l'aponévrose. Écarter les bords de la plaie avec un blépharostat;

4° Appliquer sur la paroi osseuse, vers le milieu de l'incision, et un peu en dehors de la ligne médiane, un petit trépan dont la couronne mesure environ 5 millimètres de diamètre.

Actionner le trépan; dès que la couronne mord, relever l'axe pour éviter de blesser le cerveau ; s'assurer de temps en temps de la profondeur à laquelle on se trouve ; quand la résistance cesse, enlever la rondelle osseuse avec une pince ou un petit élévateur ;

5° La dure-mère apparaît au fond de la plaie ; la traverser avec l'aiguille très obliquement pour ne pas léser le cerveau et pousser l'injection. Il est bon d'utiliser une aiguille recourbée à angle droit vers sa partie médiane ;

6° Retirer l'aiguille ; toucher la plaie avec un tampon imbibé d'eau phéniquée, suturer la peau, recouvrir la plaie de collodion.

X. — INOCULATION DANS LES VOIES DIGESTIVES.

A. **Ingestion.** — *a*). Le procédé le plus simple consiste à mélanger la culture du microbe à inoculer à la nourriture des animaux, à du

son, par exemple, pour le lapin et le cobaye, à une pâtée, pour le chien.

b). On peut encore, chez les petits animaux, aspirer la culture dans une pipette de Pasteur à effilure courte et forte, introduire l'extrémité de la pipette dans la bouche de l'animal, puis y laisser tomber le liquide goutte à goutte en maintenant la tête élevée.

c). Chez les oiseaux, faire de petites boulettes avec de la farine et la culture à inoculer, pousser ces boulettes sur la base de la langue, puis refermer le bec ; la déglutition se fait facilement.

B. **Cathétérisme de l'œsophage.** — Ce procédé est le plus précis et permet de mesurer exactement les quantités de liquide injectées.

Cobaye et lapin. — L'animal est maintenu par un aide, la tête en extension modérée; en pressant sur les joues, au niveau des molaires, on force l'animal à ouvrir la bouche et on introduit entre les mâchoires, en arrière des incisives, un petit bâillon de bois percé d'un trou central ou mieux un simple rectangle de fil de fer (fig. 117). On introduit alors facilement par le trou du bâillon une très fine sonde urétrale en gomme jusque dans l'estomac. Sur l'orifice de la sonde on adapte l'aiguille de la seringue et on pousse l'injection.

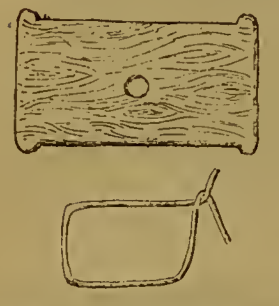


Fig. 117. — Bâillons pour le cathétérisme de l'œsophage chez le lapin et le cobaye.

Chien. — Fixer l'animal sur le dos, lui placer le bâillon décrit page 166 ; faire pénétrer dans l'estomac une sonde œsophagienne de petit calibre ou un simple tube de caoutchouc un peu rigide et de la grosseur d'un porte-plume ordinaire. Injecter la culture par la sonde.

Il est souvent nécessaire d'alcaliniser préalablement le contenu stomacal ; pour cela on injecte avant la culture un ou deux grammes de bicarbonate de soude dissous dans un peu d'eau.

C. **Injection dans l'intestin.** — 1° Pratiquer l'ouverture de l'abdomen comme il a été dit page 182 ;

2° Avec une pince attirer et fixer une anse intestinale;

3° Traverser obliquement la paroi de l'anse fixée avec l'aiguille de la seringue, pousser l'injection ; retirer rapidement l'aiguille ;

4° Toucher l'anse intestinale avec un tampon imbibé de solution phéniquée ; suturer l'aponévrose, puis la peau. Panser avec du collodion.

D. **Injection rectale.** — L'animal étant solidement fixé par un aide, pousser l'injection dans le rectum avec la seringue munie d'une aiguille forte à extrémité mousse.

CHAPITRE XI

OBSERVATION DES ANIMAUX INOCULÉS PRÉLÈVEMENT DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

A. — OBSERVATIONS

Quand on étudie une maladie microbienne, on doit observer et noter chaque jour les symptômes que présentent l'animal inoculé ou l'homme spontanément infecté.

Nous n'avons pas à insister sur l'observation des maladies humaines, c'est la base de toute éducation médicale. Chez l'animal, l'attention devra être portée sur les points suivants :

1° **Lésion locale.** — Son existence ou son absence. Date de son apparition. Son siège, son étendue, sa nature, son évolution. Présence de ganglions.

2° **Température.** — Doit être prise dans le rectum, au moins deux fois par jour, à l'aide d'un thermomètre spécial, gradué en dixièmes de degré et de taille appropriée à chaque espèce animale. Il faut savoir que la température centrale varie chez les différentes espèces animales (la température normale du cobaye et du lapin varie entre 38° et 39°) et avoir toujours la précaution de prendre la température avant l'inoculation. Chez les petits animaux, l'immobilisation complète amène rapidement un abaissement notable de la température centrale : on ne doit jamais placer le thermomètre sur un animal lié sur la table à opérations. Établir une courbe de la température.

3° **Poids.** — L'animal doit toujours être pesé avant d'être mis en expérience ; on établira ainsi une relation entre le poids de l'animal et la quantité de virus qu'il est nécessaire d'inoculer pour produire un état morbide ou entrainer la mort. Dans les maladies chroniques, l'animal sera pesé périodiquement : la courbe du poids fournit de précieux renseignements sur l'évolution de l'infection ;

4° **Auscultation.** — Permet de reconnaitre et de suivre l'évolution des lésions pulmonaires;

5° **État du tube digestif.** — Existe-t-il de l'anorexie, de la diarrhée, etc.?

6° **Urines.** — Contiennent-elles du sang, du pus, de l'albumine, etc.?

7° **Habitus extérieur.** — État de la fourrure : poil hérissé, sale, etc. L'animal est-il gai, alerte ou triste, immobile; est-il couché sur le flanc, affaissé sur l'abdomen, pelotonné en boule? Existe-t-il des paralysies, des contractures, des convulsions?

L'observation purement clinique doit être complétée par la recherche des microbes dans les tissus, les tumeurs, les exsudats de l'homme ou de l'animal malades.

B. — PRÉLÈVEMENT DES HUMEURS, TISSUS ET EXSUDATS

I. — POILS.

HOMME ET ANIMAUX.

Avec une pince flambée arracher quelques-uns des poils malades et les déposer sur une lame de verre stérilisée. En recouvrant ces poils avec une autre lame stérile et en enveloppant le tout dans un morceau de papier, on peut les conserver et les transporter purement.

II. — PEAU.

HOMME ET ANIMAUX.

1° Raser et épiler la région sur laquelle on veut opérer le prélèvement;

2° Laver la région avec une brosse à ongles et de l'alcoolé de savon; rincer à l'eau bouillie; frotter énergiquement avec un tampon d'ouate imbibé de sublimé acide au millième; rincer à l'alcool absolu, puis à l'éther; essuyer rapidement avec du papier stérilisé;

3° Avec une pince stérilisée faire un petit pli de la peau et sectionner ce pli à sa base à l'aide d'un bistouri bien effilé et stérilisé.

Si la peau est adhérente aux tissus profonds ou épaisse, on déterminé difficilement la formation d'un pli de petites dimensions; on dessinera alors un petit lambeau rectangulaire à l'aide du bistouri; on libère un angle du lambeau, puis on le soulève avec la pince et on détache alors facilement, au bistouri, le fragment de peau des tissus profonds;

4° Si l'opération a eu lieu au lit du malade, on transportera aisément le fragment de peau au laboratoire en le plaçant entre deux verres de montre flambés ou dans un verre stérilisé et recouvert de papier.

III. — CRACHATS.

HOMME.

a). Pour les recherches microscopiques usuelles, telles que celle du bacille de Koch dans les crachats, il suffit de faire cracher le malade dans un flacon ou un mouchoir propres et de pratiquer l'examen le plus tôt possible.

b). **Procédé de Kitasato.** — Doit être employé quand on veut ensemencer les crachats ou se livrer à des recherches exigeant une grande rigueur :

1° Le malade se rince plusieurs fois la bouche et l'arrière-gorge avec de l'eau bouillie, puis il crache dans une boîte de Petri stérilisée ;

2° Immédiatement le crachat est porté et agité dans un tube contenant plusieurs centimètres cubes d'eau stérile. Retiré du liquide avec une öse ou une pince flambée, le crachat est reporté dans un nouveau tube d'eau stérilisée. On pratique ainsi trois ou quatre lavages successifs. Ces lavages débarrassent de toute impureté la surface du crachat; ils ne peuvent être pratiqués que sur des crachats pelotonnés, cohérants, tels que ceux de la grippe, ceux de la tuberculose avancée (crachats nummulaires), etc. ;

3° Après les lavages, le crachat est placé dans une boîte de Petri stérilisée et avec un fin ciseau ou une öse flambés on en détache un petit fragment, pris au centre autant que possible, et qui servira à pratiquer les ensemencements.

IV. — SANG.

HOMME.

A. **Piqûre de la peau.** — Le procédé le plus simple pour se procurer une petite quantité de sang consiste à piquer la pulpe du doigt et à recueillir les gouttelettes avec une pipette Pasteur ou sur une lame ou dans un petit tube flambés. Mais ce procédé expose à de fréquentes contaminations et n'est recommandable que lorsque le sang doit être examiné immédiatement au microscope (recherche du bacille du charbon, de l'hématozoaire du paludisme, etc.). Pour la pratique des ensemencements, il est préférable de prélever le sang dans une veine.

Opération. — 1° Laver la pulpe d'un doigt avec l'alcoolé de savon, le sublimé, l'alcool et l'éther, comme il a été dit plus haut ; sécher avec du papier stérilisé ;

2° Comprimer la base du doigt en la serrant avec la main gauche ou en y appliquant un lien circulaire ;

3° Avec une épingle ou une lancette flambées, piquer la peau rapidement et profondément ;

4° Essuyer avec un papier stérilisé la première goutte de sang qui sort de la piqûre, recueillir les suivantes.

Pour plus de sécurité, on peut, après avoir lavé et essuyé la peau, recouvrir la place où portera la piqûre avec une très légère couche de collodion ; on enfonce l'épingle au centre du collodion : de cette façon on évite tout contact entre le sang et la peau.

B. **Procédé de la ventouse.** — Ce procédé participe à tous les inconvénients du précédent, mais permet d'obtenir une grande quantité de sang :

1° Nettoyer comme de coutume et aseptiser la peau du thorax, du dos ou des flancs sur une étendue d'environ un décimètre carré ;

2° Sur cette place, appliquer une ventouse préalablement stérilisée ;

3° Quand la ventouse a pris, l'enlever (les mains de l'opérateur doivent avoir été passées au sublimé), scarifier avec un rasoir flambé, puis appliquer de nouveau une ventouse stérile ;

4° Quand on a recueilli dans la ventouse une quantité suffisante de sang, détacher celle-ci ; pour cela il faut avoir soin de faire placer le malade de telle sorte que le sang ne puisse se répandre. Recouvrir immédiatement la ventouse avec un papier stérilisé.

C. **Prise dans une veine. — Procédé de choix.** — Ce procédé, absolument inoffensif, moins douloureux que les précédents et permettant d'éviter toute contamination, est le seul recommandable à notre avis quand le sang doit servir à pratiquer des ensemencements.

Choisir une veine du pli du coude.

1° Préparer une seringue stérilisable, de 2 à 20 centimètres cubes, selon la quantité de sang nécessaire, et munie d'une aiguille bien perméable et bien acérée ; s'assurer du parfait fonctionnement de l'instrument. Stériliser la seringue et l'aiguille réunies, par immersion de quinze minutes dans l'eau bouillante ;

2° L'avant-bras du patient étant étendu sur le lit, le long du corps, faire comprimer par un aide ou serrer avec un tour de bande le bras au niveau de sa partie moyenne, comme dans l'opération de la saignée ;

3° Laver la peau du pli du coude à l'alcoolé de savon, sublimé,

alcool et éther. Sous l'influence de la compression et des frictions les veines du pli du coude deviennent turgescentes ;

4° Choisir la veine la plus volumineuse ; traverser la peau, puis la paroi veineuse avec l'aiguille de la seringue. La veine située immédiatement sous la peau est d'ordinaire pénétrée en même temps que celle-ci. L'aiguille doit être enfoncée parallèlement à l'axe de la veine et à angle très aigu par rapport à la surface de la peau. Dès qu'on a pénétré dans la veine, en élevant légèrement le piston on voit le sang monter dans la seringue ;

Il est inutile de s'attacher à enfoncer l'aiguille en la dirigeant vers l'extrémité du membre ; il est souvent plus aisé de la diriger au contraire vers le bras ; le calibre de la veine est tel que le sang n'en afflue pas moins très facilement dans la seringue.

5° La seringue étant remplie, retirer l'aiguille de la veine, faire cesser la compression et appliquer un peu de collodion sur la piqûre. Avoir soin de ne pas laisser le sang se coaguler dans la seringue : le chasser immédiatement dans un tube à essai stérilisé ; laver avec soin la seringue à l'eau froide, puis la stériliser.

Le procédé que nous venons de décrire doit être employé à l'exclusion absolue de celui qui consiste à pratiquer d'abord une incision de la peau, puis à faire pénétrer directement l'aiguille dans la veine mise à nu.

CHEVAL, ANE, BOVIDÉS.

Opérer sur la jugulaire, comme il a été dit à propos de la préparation du sérum (p. 48). Quand on veut recueillir une petite quantité de sang on substitue au trocart décrit une seringue de Debove, semblable à celle que nous avons utilisée chez l'homme.

LAPIN.

A. **Veines de l'oreille.** — Le plus ordinairement, chez le lapin, on prélève le sang dans une veine de l'oreille ; ce procédé est le plus simple et donne d'excellents résultats ; on peut ainsi obtenir facilement 20 centimètres cubes de sang chez un lapin adulte :

1° L'animal est maintenu sur les genoux d'un aide ou sur ceux de l'opérateur ; l'oreille est saisie et lavée comme d'ordinaire, après que les poils en ont été coupés sur le trajet de la veine marginale (Voy. p. 179). Une pince à pression est posée sur la racine de l'oreille.

2° On a préparé d'avance une pipette Pasteur de grandes dimensions dont l'effilure forte et courte est coudée à angle obtus, comme

il est représenté dans la figure 118; l'extrémité de l'effilure est aiguë et les bords en sont maintenus tranchants. La pipette ainsi préparée est stérilisée dans la flamme du bec Bunsen, puis laissée refroidir. Cet instrument est préférable, dans le cas actuel, à la seringue.



Fig. 118. — Pipette pour recueillir du sang dans la veine auriculaire du lapin.

3° L'oreille étant tendue avec la main gauche, on enfonce la pointe de la pipette à travers la peau, puis à travers la paroi veineuse : dès que celle-ci est pénétrée, le sang monte dans la pipette. Il faut avoir soin de pénétrer bien parallèlement à l'axe de la veine pour ne pas être exposé à traverser les deux parois du vaisseau ; la pointe de la pipette est dirigée toujours vers l'extrémité, et non vers la racine de l'oreille.

Le sang monte lentement dans la pipette ; s'il s'arrêtait, c'est qu'un petit caillot se serait formé au niveau de l'effilure; on déplacera facilement ce caillot en pratiquant une aspiration légère par l'extrémité bouchée à l'ouate de la pipette.

Il est bon de commencer par piquer la veine très près de la racine de l'oreille; en cas d'insuccès de l'opération, on recommencerait en pratiquant la piqûre un peu plus bas, vers l'extrémité de l'oreille. En utilisant successivement les veines des deux oreilles on peut pratiquer, à intervalles plus ou moins rapprochés, un très grand nombre de prélèvements de sang sur un même animal.

4° Le sang recueilli, retirer la pipette et en fermer à la lampe l'extrémité effilée ; le sang peut être ensuite aspiré dans une ou plusieurs pipettes Pasteur par l'extrémité bouchée à l'ouate du tube qui a servi au prélèvement ; avoir soin de flamber très fortement le bouchon d'ouate avant de le retirer.

5° Placer un instant la pince à pression sur la piqûre de l'oreille pour arrêter l'écoulement de sang; après l'opération l'animal présente une soif vive ; on doit laisser de l'eau à sa disposition.

B. Veine jugulaire. — La veine jugulaire externe est superficiellement située chez le lapin, comme chez le cobaye et le chien ; elle est recouverte par la peau, l'aponévrose et du tissu cellulaire ; elle suit une ligne partant de l'angle de la mâchoire pour aboutir au milieu de l'espace qui sépare l'épaule du sternum (fig. 119).

Pour la découvrir :

1° Fixer l'animal sur le dos, maintenir la tête en extension, raser la peau de la face antérieure du cou et la désinfecter comme de coutume.

2° Sur le milieu de la ligne de direction de la veine, inciser la peau et le peaucier, écarter le tissu cellulaire avec le bec de la sonde cannelée : la veine apparaît dans la plaie.

3° Pénétrer très obliquement dans le vaisseau avec l'aiguille d'une seringue stérilisée ou la pointe de la pipette décrite au paragraphe

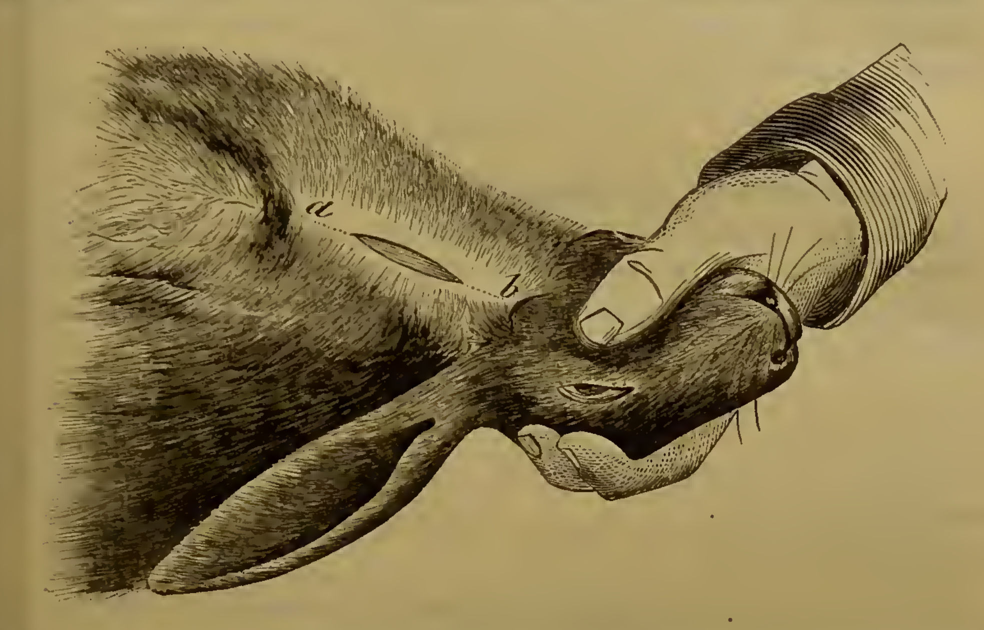


Fig. 119. — Veine jugulaire du lapin, direction de l'incision (*a*, *b*) par laquelle on arrive sur cette veine (Claude Bernard).

précédent ; un fil glissé sous la veine au moyen de l'aiguille de Deschamps, au-dessous de la piqûre (du côté du cœur) permettra de comprimer le vaisseau et facilitera l'accès du sang dans la pipette.

4° Le sang prélevé, retirer l'aiguille ou la pipette, s'assurer qu'il ne se produit pas d'hémorragie par la piqûre, auquel cas on placerait deux ligatures, une au-dessus, l'autre au-dessous de l'orifice d'entrée de l'instrument ; placer sur la peau deux ou trois points de suture et recouvrir la plaie de collodion.

C. **Artères carotide et crurale.** — 1° Mettre à découvert celui de ces vaisseaux que l'on a choisi (Voy. p. 181 la technique de cette opération) ;

2° Piquer obliquement la paroi de l'artère avec l'aiguille ou la pointe de la pipette coudée ;

3° Quand le sang a pénétré dans la pipette ou la seringue, retirer l'instrument ; suturer la peau ; appliquer du collodion sur la plaie.

Quelquefois une hémorragie se produit par la piqûre après que l'on a retiré l'aiguille de l'artère ; pour obvier à cet accident, il est bon de placer préventivement sous le vaisseau deux fils, l'un au-dessus, l'autre au-dessous de la piqûre ; si l'hémorragie se produit, lier les

deux fils de manière à isoler la portion du vaisseau sur laquelle a porté le traumatisme.

COBAYE.

Opérer sur la veine jugulaire ou sur les artères fémorale ou carotide en se conformant en tous points aux indications que nous avons données pour le lapin.

CHIEN.

On pratiquera le prélèvement sur la veine saphène externe (Voy. p. 180) ou sur la veine jugulaire, les artères carotide et fémorale; on se conformera aux règles habituelles en se servant d'une pipette ou de la seringue de Debove. Le sang du chien se coagule rapidement.

OISEAUX.

Opérer sur la veine axillaire (Voy. p. 180) en prenant les précautions ordinaires.

V. — EXSUDATS PHARYNGIENS.

HOMME.

A. **Piqûre de l'amygdale.** — 1° Faire rincer soigneusement la bouche du malade à l'eau bouillie pour la débarrasser des mucosités;

2° Faire asseoir le malade devant une fenêtre, l'engager à l'immobilité en lui exposant l'innocuité de l'opération, abaisser la langue avec l'abaisse-langue;

3° Prendre de la main droite une pipette Pasteur un peu longue à effilure forte et terminée par une pointe aiguë à bords tranchants, en chauffer fortement l'extrême pointe, la porter rapidement dans la bouche et l'enfoncer en plein tissu de l'amygdale. La pointe chaude cautérise la surface de la glande, détruit par conséquent les germes qui s'y trouvent et arrive pure et refroidie dans les couches profondes; aspirer légèrement par l'extrémité bouchée à l'ouate de la pipette, puis retirer l'instrument;

4° On n'obtient ainsi qu'une très faible quantité de matière; pour pratiquer l'ensemencement, on porte immédiatement l'extrémité de la pipette dans un tube de bouillon stérile et on aspire et refoule à deux ou trois reprises un peu de bouillon dans la pipette.

B. **Récolte de fausses membranes.** — Après avoir fait rincer la bouche du malade avec de l'eau bouillie, abaisser la langue et déta-

cher les fausses membranes à l'aide d'une pince à forcipressure stérilisée.

Si la fausse membrane est friable, la pince ne peut la saisir; on la détachera alors par friction à l'aide d'un petit tampon de coton stérile fixé sur les mors d'une pince.

La fausse membrane détachée est portée entre deux feuilles de papier stérilisé, entre lesquelles on la comprime légèrement pour débarrasser sa surface des impuretés qui peuvent s'y rencontrer.

VI. — ABCÈS.

HOMME.

1° Raser, s'il en est besoin, la surface de l'abcès; nettoyer la peau comme de coutume;

2° Pénétrer dans l'abcès avec l'aiguille de la seringue stérilisée, aspirer le pus dans la seringue; utiliser dans cette opération une aiguille à large lumière;

3° Si le pus est trop épais pour être aspiré dans la seringue, pratiquer une petite incision de la peau; par l'incision faire pénétrer la grosse effilure d'une pipette Pasteur et aspirer le pus dans la pipette; on peut encore, lorsque l'incision a été faite, prélever du pus à l'aide d'une öse.

ANIMAUX.

1° Raser les poils et cautériser un point de la surface de l'abcès avec une tige de fer fortement chauffée;

2° Au centre de l'escarre faire pénétrer l'effilure d'une pipette Pasteur et y aspirer le pus.

VII. — EXSUDATS DES PLÈVRES ET POUMONS.

HOMME.

On peut prélever aisément une petite quantité d'un épanchement pleural au moyen d'une seringue stérilisée. Il est indispensable d'utiliser une aiguille longue de cinq à sept centimètres et à large lumière. Dans les épanchements purulents, quand le pus est épais, grumeleux, on a avantage à se servir d'un petit trocart s'adaptant à la seringue de Debove.

1° Aseptiser la peau;

2° Pénétrer dans un espace intercostal avec l'aiguille montée sur la seringue, puis aspirer le liquide dans la seringue;

3° L'opération terminée, projeter le liquide dans un tube à essai stérilisé.

Ces ponctions, absolument inoffensives, peuvent être multipliées.

La même technique permet, quand il n'existe pas d'épanchement pleural, de ponctionner le poumon, de pénétrer, par exemple, au centre d'un foyer de pneumonie reconnu par l'auscultation; on enfonce alors l'aiguille perpendiculairement, jusqu'à la garde, dans l'espace intercostal et l'aspiration amène dans la seringue un liquide sanguinolent.

On opérerait de même chez les animaux.

VIII. — LIQUIDE D'ASCITE.

HOMME.

On peut prélever purement de grandes quantités de sérosité ascitique en employant un trocart semblable à celui décrit page 47, muni du même ajutage stérilisé et en recueillant le liquide dans un bocal bouché au papier. On conduira l'opération avec les précautions indiquées pour la récolte du sang chez le cheval, en observant d'autre part les règles ordinaires de la ponction de l'abdomen chez l'homme. Rappelons que la peau doit être aseptisée avec soin.

IX. — LAIT.

Opérer comme il a été dit page 32.

X. — MATIÈRES FÉCALES.

Les matières sont recueillies dans un vase rincé à l'eau bouillante, on évite avec soin le mélange d'urine.

Quand les matières sont solides, on en cautérise la surface avec une tige de fer rougie et on effectue le prélèvement au centre avec une öse; les fèces liquides sont aspirées dans une pipette Pasteur.

XI. — URINES.

HOMME ET GRANDS ANIMAUX.

Suivre exactement la technique exposée page 33.

PETITS ANIMAUX (*lapin, cobaye, etc.*).

Chez ces animaux l'introduction de la sonde étant impossible, on recueille l'urine, chez le mâle, au moment où elle sort de l'urètre.

en se servant d'une pipette Pasteur ou d'un tube à essai stérilisé. Pour pratiquer ce prélèvement, il est indispensable de fixer l'animal sur le dos, sur le plateau; on provoque facilement l'émission d'urine en entourant l'abdomen et les lombes de l'animal avec un linge imbibé d'eau très froide.

XII. — TUMEURS ET GANGLIONS.

Les extirper selon les procédés chirurgicaux, en observant une asepsie rigoureuse (nettoyage de la peau, stérilisation des instruments, des mains, etc.) et en évitant de toucher avec les doigts la partie à enlever.

L'organe une fois énucléé, on devra en cautériser un point de la surface avec une tige de fer fortement chauffée, puis opérer le prélèvement avec une öse ou un bistouri flambés, en passant au centre de l'escarre.

XIII. — RATE.

PONCTION DE LA RATE (*homme*).

Cette opération a été utilisée pour retirer le bacille d'Eberth de la rate des typhiques (diagnostic) et dans l'étude de certaines infections.

1° S'assurer des dimensions exactes de la rate par les procédés ordinaires de percussion ; aseptiser la peau.

2° Au centre de la matité splénique, enfoncer perpendiculairement à la peau une aiguille longue de quatre à cinq centimètres et reliée à la seringue de Debove par l'ajutage en caoutchouc (p. 174). Pratiquer l'aspiration, retirer l'aiguille, appliquer un peu de collodion sur la piqûre.

3° On n'obtient d'ordinaire que quelques gouttes de sang; pour pratiquer l'ensemencement, il faut aspirer le bouillon dans la seringue de manière à laver et entraîner ce sang.

L'usage de l'ajutage en caoutchouc est indispensable : il laisse à l'aiguille une certaine mobilité qui lui permet de suivre les mouvements de la rate et éloigne le danger de déchirure de cet organe.

La ponction de la rate est d'ailleurs une opération d'exception à laquelle on n'aura que rarement recours.

ABLATION DE LA RATE (*animaux*).

Cette opération est pratiquée fréquemment chez les animaux quand on se propose d'étudier l'influence de l'organe splénique sur les infections.

L'ablation de la rate peut être pratiquée sur tous les animaux de laboratoire, mais elle est particulièrement bien supportée par le chien et le rat.

La rate occupe le flanc gauche, au niveau des dernières fausses côtes, au voisinage de la courbure gauche de l'estomac.

1° Fixer l'animal sur la table en le couchant sur le flanc droit; il est bon de l'anesthésier;

2° Raser et désinfecter la peau du flanc gauche; asepsier avec soin les instruments; se laver les mains et les désinfecter;

3° Immédiatement au-dessous du rebord de la dernière côte, à partir de l'angle de cette côte et parallèlement à l'os, inciser la peau et le tissu cellulaire sur une étendue de quelques centimètres;

4° Sectionner en utilisant la sonde cannelée l'aponévrose du grand oblique, puis le petit oblique;

5° Séparer les fibres du transverse à l'aide du bec de la sonde;

6° Inciser le péritoine d'un bout à l'autre de la plaie;

7° On aperçoit la rate, ou le doigt va la chercher au voisinage de la courbure de l'estomac; l'attirer au dehors en veillant avec soin à ce qu'elle ne se déchire pas;

8° Écarter l'épiploon qui accompagne la rate et poser une ligature solide, à la soie, sur les vaisseaux du hile; sectionner le pédicule en avant de la ligature;

9° Placer deux plans de sutures, le premier sur les muscles, le second sur la peau; recouvrir la plaie de collodion.

CHAPITRE XII

TECHNIQUE DES AUTOPSIES

Les autopsies microbiologiques ont pour but : 1° de faire connaître la nature des lésions qui ont entraîné la mort de l'animal d'expérience; 2° de permettre de recueillir purement le sang, les humeurs, les pulpes d'organes, où doivent être recherchés les microbes par l'examen microscopique, les cultures, les inoculations), et de prélever des fragments d'organes devant servir à la confection des coupes.

Dans la pratique d'une autopsie on doit se conformer aux règles suivantes :

A. — Éviter de souiller la table, les objets environnants avec les produits provenant du cadavre; les cadavres doivent toujours être placés sur un plateau en zinc; tout instrument ayant servi ne sera plus déposé sur la table, mais sur le plateau, jusqu'à la fin de l'opération.

B. — Les mains de l'opérateur ne doivent jamais entrer en contact direct avec le cadavre; la peau, les plans musculaires, les différents organes sont soulevés et maintenus à l'aide de pinces à dissection.

C. — Les instruments utilisés par l'autopsie doivent être préalablement stérilisés pour éviter qu'ils n'apportent aucune souillure aux organes avec lesquels ils entrent en contact.

D. — Les autopsies doivent être pratiquées aussitôt après la mort de l'animal.

E. — L'autopsie terminée, le cadavre, le papier, l'ouate, qui ont été utilisés sont détruits par le feu ; les instruments sont soumis à l'ébullition; le plateau à autopsie est plongé également dans l'eau bouillante, si ses dimensions le permettent; en cas contraire il est lavé avec soin avec une solution forte de crésyl ou d'acide phénique.

Instruments nécessaires. — Avant de pratiquer l'autopsie il faut préparer et tenir à portée de la main les instruments suivants :

1° Des scalpels et bistouris, des pinces à dissection, des ciseaux gros et fins, qui sont préalablement stérilisés par ébullition;

2° Des pipettes Pasteur stérilisées;

3° Des öses de platine dont une forte, écrasée en spatule;

4° Une tige de fer longue de 15 à 20 centimètres, de la grosseur d'une forte plume d'oie et montée sur un manche en bois;

5° Un plateau à autopsie en zinc (fig. 101), et en plus, pour les petits animaux, une planchette de liège de 10 à 15 millimètres d'épaisseur;

6° De l'ouate hydrophile stérile dans un flacon en verre bouché par un tampon de coton, et du papier stérile.

Pour stériliser le papier filtre on en découpe des morceaux d'environ 10 centimètres carrés; plusieurs de ces morceaux sont enveloppés dans une feuille de papier et stérilisés au four à flamber;

7° Une cuvette émaillée ou un cristallisoir de verre contenant une solution de sublimé au millième;

8° Une lampe à alcool ou un bec de Bunsen;

9° Des tubes de bouillon, gélose, etc.;

10° Des flacons à large ouverture, de 30 à 50 centimètres cubes de capacité, et bouchés à l'émeri.

AUTOPSIE.

I. — PRÉCAUTIONS PRÉLIMINAIRES.

1° Le cadavre à autopsier doit être fixé solidement. Les animaux tels que lapins, cobayes, chats, etc., sont couchés sur le dos dans le plateau à autopsie et maintenus par quatre liens noués autour des pattes (nœud coulant) et fixés dans l'un des trous du plateau.

Les petits animaux, tels que grenouilles, souris, moineaux, sont fixés à l'aide d'épingles sur la planchette de liège, le ventre en l'air, une épingle fixant le cou, deux autres les pattes, deux enfin maintenant les ailes étendues.

Pour les pigeons et les poules, on coupe les ailes, on couche l'animal, le ventre en l'air, sur le plateau en zinc, le cou est enserré par un lien fixé dans un trou du plateau, chaque patte est fixée de même.

2° Avant l'ouverture du cadavre, il faut couper avec soin les poils sur toutes les parties où porteront les sections. Éviter de couper les poils à sec pour qu'ils ne se répandent pas dans le laboratoire : l'animal étant fixé on mouille les poils de la face antérieure du thorax et de l'abdomen avec un tampon d'ouate imbibé de sublimé, puis on les coupe avec un ciseau courbe; les poils détachés

ont immédiatement réunis dans un morceau de papier qui sera étruit par le feu. Pour les oiseaux, on arrache avec les mêmes pré-autions les plumes de la partie ventrale du corps.

II. — EXAMEN EXTÉRIEUR DU CADAVRE.

Avant de pratiquer l'ouverture, on doit rechercher si le cadavre e présente pas de lésions du tégument, d'abcès, etc. ; si l'on doit ecueillir le pus d'un abcès, après avoir coupé les poils à son niveau, n cautérise fortement la peau avec la baguette de fer rougie dans ı flamme ; immédiatement, on flambe et casse la pointe d'une ipette Pasteur, on en introduit l'effilure dans l'abcès, au centre de espace cautérisé, et en aspirant par l'extrémité bouchée à l'ouate on ıit monter le pus dans la pipette.

Certains animaux, tels que le lapin, font un pus épais, concret, on susceptible d'être aspiré dans la pipette; dans ce cas, après autérisation de la peau on pratique une incision avec un bistouri ortement flambé et on puise directement dans l'abcès, soit avec la ointe du bistouri, soit avec une öse forte. Avec le pus ainsi pré-vé on ensemence directement les tubes de culture (Voy. p. 61) et n prépare des lamelles comme nous le verrons plus loin.

III. — OUVERTURE DU CADAVRE.

On doit toujours commencer l'autopsie par l'ouverture du thorax ; n ouvrant d'abord l'abdomen on s'expose à souiller irrémédiable-ient les organes thoraciques.

a. **Mammifères.** — 1° Soulever la peau avec une pince au niveau e la fourchette sternale, l'inciser avec un bistouri à ce niveau, puis rolonger l'incision, qui n'intéresse que le tégument, jusqu'à la artie inférieure de l'abdomen ; libérer la peau par une petite inci-on sur la racine de chaque membre, la disséquer et rejeter de ıaque côté les deux lambeaux obtenus.

2° A ce moment, si on soupçonne un épanchement pleural, cauté-ser la paroi musculaire dans un espace intercostal, enfoncer la ointe flambée d'une pipette au centre de l'escarre, aspirer un peu u liquide (ensemencer et préparer des lamelles).

3° Pour ouvrir le thorax, saisir avec une forte pince l'appendice yphoïde du sternum, l'attirer en haut, engager un peu en dehors, ous les cartilages costaux, la pointe de forts ciseaux, sectionner ces artilages, en se portant progressivement en dehors, jusqu'à la cla-icule, couper cet os lui-même ; reporter les ciseaux de l'autre côté

du sternum et opérer de même; on délimite ainsi un plastron qu'on rabat en haut et qu'on détache complètement au besoin.

4° Le cœur et les poumons étant ainsi mis à nu, s'il existe un épanchement dans le péricarde, on saisit la séreuse avec une pince flambée et tout près de la pince on enfonce dans le péricarde la pointe, fortement chauffée, d'une pipette Pasteur : on cautérise ainsi la membrane au moment même où on la pénètre et on évite toute chance de contamination ; aspirer alors le liquide péricardique.

5° Pour arriver au cœur, déchirer le péricarde entre deux pinces ou l'inciser avec une pince et des ciseaux fins; cautériser alors la surface du cœur au niveau d'un ventricule avec la tige de fer portée au rouge, enfoncer au fond de l'escarre la pointe d'une pipette, aspirer le sang dans la pipette.

6° Pour recueillir du suc pulmonaire au niveau d'un point splénisé ou hépatisé, cautériser la surface du poumon avec la tige de fer. puis y enfoncer la pointe d'une pipette ou l'extrémité recourbée d'une forte öse de platine. On pourrait encore déchirer la surface du poumon entre deux pinces stériles et pénétrer directement par la déchirure avec un instrument flambé.

7° Les opérations terminées du côté du thorax, on passe à l'ouverture de l'abdomen.

Si on soupçonne un épanchement péritonéal, après avoir soulevé avec une pince la paroi musculaire, on y pratique une très petite boutonnière avec la lame fortement chauffée d'un scalpel; par l'incision, on introduit, parallèlement à la paroi et en évitant de léser l'intestin, la pointe flambée d'une pipette; on aspire le liquide en se portant vers les flancs.

Achever ensuite la section de la paroi musculaire, sur la ligne médiane, sur toute la hauteur de l'abdomen, récliner cette paroi à droite et à gauche.

8° Examiner les organes. Pour prélever de la pulpe du foie, de la rate, des reins, des ganglions, etc., cautériser la surface de ces viscères, puis faire pénétrer, par la surface cautérisée, une öse forte à extrémité recourbée en crochet, l'enfoncer dans la profondeur, la ramener à soi par quelques mouvements de latéralité; ensemencer la pulpe obtenue. Pour préparer les frottis, il suffit d'arracher un fragment de viscère avec une pince à dissection (Voy. chap. XIII). Si on veut examiner le contenu intestinal, cautériser la surface de l'intestin, pénétrer avec une pipette, aspirer.

Agir de même pour retirer l'urine contenue dans la vessie; on facilite l'opération en jetant préalablement une ligature sur l'urèthre.

b). **Oiseaux.** — L'incision du thorax doit être faite suivant une ligne courbe partant de la naissance du cou, embrassant le côté droit du sternum, contournant la pointe de cet os et remontant sur le côté gauche. Pour cela, la peau étant incisée sur la ligne médiane, disséquée et réclinée à droite et à gauche, pratiquer une incision allant jusqu'à l'os, suivant la ligne indiquée, engager la pointe de forts ciseaux sous la clavicule droite, la sectionner, descendre en suivant l'incision des parties molles, libérer la pointe du sternum, remonter du côté gauche et terminer en sectionnant la clavicule ; relever et détacher le plastron formé par l'os bréchet et les pectoraux.

Pour le reste, opérer comme précédemment.

c). **Moelle osseuse.** — Pour recueillir la moelle osseuse, mettre à nu un os long, le sectionner perpendiculairement à son axe avec de forts ciseaux chauffés dans la flamme et par l'orifice du canal médullaire enfoncer une pipette de Pasteur ou une öse de platine.

On pourrait encore, pour éviter de flamber les ciseaux, sectionner avec des ciseaux non flambés et cautériser ensuite la surface de section osseuse avec une tige de fer rougie, avant d'opérer le prélèvement.

d). **Autopsie des centres nerveux.** — Pour autopsier les centres nerveux, on fixe le cadavre sur le ventre sur le plateau à autopsie, les pattes étant attachées comme il a été dit plus haut.

Pratiquer alors une incision de la peau depuis la racine du nez jusqu'au sacrum en suivant la ligne des apophyses épineuses ; libérer et écarter la peau ; avec un bistouri fort, détacher les masses musculaires dans les gouttières vertébrales, de façon à mettre à nu les lames des vertèbres ; opérer avec précaution en arrivant au niveau de la région lombaire, pour ne pas ouvrir la cavité abdominale.

Avec une pince de Liston coudée, inciser les os du crâne sur une ligne horizontale joignant les deux arcades sourcilières ; libérer de chaque côté ces arcades par une incision oblique ; le frontal est alors soulevé avec un davier, le dégager à l'aide de la pince de Liston. On découvre ainsi l'encéphale ; arrivé au trou occipital, le davier saisit les apophyses épineuses pendant que la pince, pénétrant alternativement à droite et à gauche dans le canal vertébral, sectionne les lames des vertèbres ; on détache ainsi un chapelet formé par les parties postérieures des vertèbres unies par les ligaments dorsaux ; une certaine habitude et un peu de patience sont indispensables pour ne pas léser la moelle dans cette opération.

S'il existe un épanchement méningé, on cautérise la surface des

membranes et on pénètre au centre de l'escarre avec une pipette flambée où l'on aspire le liquide.

Pour prélever de la pulpe de la substance nerveuse, déchirer les méninges entre deux pinces, cautériser la surface de l'organe (cerveau, cervelet, bulbe, moelle), y enfoncer une pipette à effilure un peu grosse où l'on fera pénétrer la pulpe par une aspiration énergique aidée de quelques mouvements communiqués à la pipette; on pourrait encore, après cautérisation de la surface, charger une öse de pulpe ou prélever de petits fragments avec un bistouri flambé.

e). **Autopsies humaines.** — Tout ce que nous venons de dire est applicable aux autopsies humaines : les pulpes, les liquides seront recueillis comme nous l'avons indiqué après cautérisation de la surface de l'organe.

Bien se souvenir que l'autopsie bactériologique, pour donner des résultats certains, doit être pratiquée dans les premières heures qui suivent la mort ; les résultats obtenus quand l'autopsie a été faite dans les délais légaux (vingt-quatre heures après la mort) ne doivent être, surtout en été, acceptés qu'avec réserve; la constatation de la présence du bacterium coli dans les organes n'a, en particulier, aucune valeur, ce microbe pullulant quelquefois dans le cadavre immédiatement après la mort et même pendant l'agonie.

Remarque. — Les produits pathologiques extraits du cadavre peuvent être ensemencés de suite comme nous l'avons dit au cours de notre description, ou encore conservés dans les pipettes en ayant soin de sceller l'extrémité effilée de celles-ci sur une petite flamme. Pour retirer le contenu de la pipette ainsi fermée, on enfonce le bouchon d'ouate jusqu'au voisinage du niveau du liquide et on coupe la pipette à la hauteur de l'ouate avec le couteau à verre et une pointe de verre rougie ; on peut dès lors enlever le bouchon à volonté et puiser dans la pipette comme dans un tube de culture.

IV. — PIÈCES DESTINÉES A LA PRÉPARATION DES COUPES.

Les fragments d'organes destinés à être coupés doivent être prélevés au moment même de l'autopsie.

Ces fragments doivent être de petites dimensions (10 à 15 millimètres de côté) ; ils sont détachés par une section aussi nette que possible pratiquée avec un bistouri stérile et bien effilé et immédiatement plongés dans un petit flacon bouché à l'émeri contenant l'un des liquides fixateurs suivants :

1° Alcool absolu.

15 à 30 centimètres cubes par fragment; renouveler plusieurs ·is le liquide pendant trois à quatre jours; au bout de ce temps les èces peuvent être utilisées. Les pièces peuvent être conservées ngtemps dans l'alcool sans subir d'altérations.

C'est le fixateur le plus simple à employer et le plus généralement ilisé; on n'aura recours aux autres réactifs que dans des cas ·éciaux.

2° Sublimé acide.

Solution aqueuse saturée de sublimé	100	parties.
Acide acétique cristallisable	5	—

20 à 30 centimètres cubes par fragment; la pénétration est très ·nne et très rapide, les pièces immergées peuvent avoir un cer-in volume. Au bout de douze heures d'action, porter dans l'alcool 70°, puis à 80°, 96° et 100° à intervalles de vingt-quatre heures; pièce peut alors être utilisée ou conservée dans l'alcool absolu.

3° Liqueur de Flemming.

Solution aqueuse d'acide chromique à 1 p. 100	15	parties.
— — osmique à 2 p. 100	4	—
Acide acétique cristallisable	1	partie.

S'emploie comme le précédent; la pénétration est plus lente (trente-x à quarante-huit heures), mais la fixation est souvent plus satisfai-nte. La liqueur de Flemming donne de bons résultats dans l'étude ı système nerveux.

4° Mélange sublimé-Flemming.

Le mélange de sublimé acide et de liqueur de Flemming participe ·s avantages de chacune de ces solutions. On le prépare selon la rmule suivante :

Solution aqueuse saturée de sublimé	500	centimètres cubes.
— — d'acide chromique à 1 p. 100	500	—
Acide osmique cristallisé	1	gramme.
Acide acétique glacial	100	centimètres cubes.

Durée d'action : vingt-quatre heures; placer ensuite les pièces ·ns l'alcool comme il a été dit plus haut.

Dans le chapitre suivant nous traiterons de la confection et de la loration des coupes.

CHAPITRE XIII

RECHERCHE DES MICROBES DANS LES HUMEURS ET LES ORGANES

HUMEURS ET PULPES.

L'examen des produits récoltés sur l'homme ou l'animal vivants et sur le cadavre constitue un des chapitres les plus importants de la technique bactériologique.

Cet examen doit être pratiqué :

1° A l'état frais, sans coloration préalable;

2° Après dessiccation et coloration.

I. — EXAMEN SANS COLORATION.

a). **Humeurs**. — Le sang, les exsudats liquides, le pus, sont recueillis, comme nous l'avons dit précédemment, dans une pipette Pasteur; ils doivent être examinés immédiatement.

On a préparé à l'avance des lames et des lamelles scrupuleusement nettoyées (Voy. p. 127), passées à l'alcool, essuyées avec un linge fin ne peluchant pas, et flambées dans la flamme chauffante du bec de Bunsen.

Si l'on veut, par exemple, examiner du sang, aussitôt que celui-ci est recueilli on en dépose une goutte sur une lame porte-objet et on recouvre avec une lamelle; le sang s'étale immédiatement entre la lame et la lamelle; en pressant légèrement sur cette dernière on fait sortir, sur les bords, l'excès de sang, excès que l'on essuie avec un linge fin; on obtient ainsi une couche de sang très mince et uniforme dont l'examen est pratiqué immédiatement.

Si la lame et la lamelle n'étaient pas d'une propreté extrême, la goutte de sang ne s'étalerait pas et l'examen en serait difficile sinon impossible; il est de toute nécessité que les hématies ne se groupent pas en piles, ce qui masquerait la présence des microbes.

Si l'examen devait être prolongé très longtemps, il serait bon de luter à la paraffine les bords de la lamelle, mais, le plus fréquemment, cette précaution est inutile, la coagulation du sang, au contact de l'air, sur les bords de la préparation, constituant une occlusion suffisante pour préserver les parties centrales de la dessiccation.

On opérerait de même pour les sérosités, le pus liquide, etc. ; quand le pus est concret, il est nécessaire de le traiter comme les pulpes d'organes.

b). **Pulpes d'organes.** — Les pulpes d'organes, recueillies comme nous l'avons dit au chapitre précédent, sont portées avec l'öse dans une gouttelette d'eau filtrée ou mieux de sérum artificiel (eau 1000, NaCl 7, filtrer) sur une lame porte-objet; on délaye avec l'öse, puis on recouvre avec une lamelle et on examine immédiatement.

Les préparations obtenues doivent être examinées avec l'objectif 8 ou 9 (Reichert, Leitz, Verick, Nachet) et l'oculaire I ou II.

II. — EXAMEN APRÈS COLORATION.

Les liquides et les pulpes destinés à subir l'action des réactifs colorants doivent être desséchés en couche mince sur une lame ou une lamelle, puis être soumis à la *fixation* qui immobilise les éléments cellulaires dans leur forme et les fait adhérer à la surface du verre. Alors seulement la préparation peut subir l'action des solutions colorantes et des liquides de lavage.

A. — PRÉPARATION DES LAMELLES ET FROTTIS.

1. **Liquides.** — Les liquides, tels que le sang, les sérosités, le pus, sont traités de la façon suivante :

1° Déposer une goutte du liquide à examiner au centre d'une lamelle très propre tenue par un de ses angles *a*;

2° Recouvrir immédiatement la goutte avec une seconde lamelle que l'on place sur la première de façon à en faire alterner les angles ;

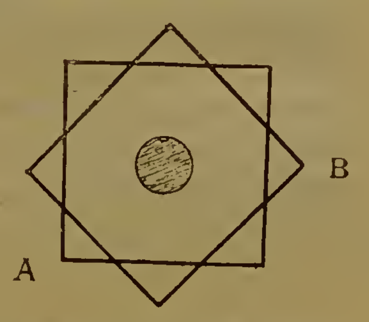


Fig. 120. — Préparation des lamelles.

3° Saisir la seconde lamelle par l'angle A ; opposé à l'angle A de la première, et séparer les deux lamelles en les faisant glisser l'une sur l'autre ; le liquide s'étale en une couche mince et uniforme ;

4° Laisser sécher à l'air, ou mieux sur une platine chauffante portée à 40°-45°, les deux lamelles ainsi préparées;

3° **Fixation**. — Il existe deux procédés de fixation :

a). *Chaleur*. — La lamelle tenue par un de ses angles avec la pince de Cornet, la face enduite regardant en haut, est passée par trois fois dans la flamme chauffante du bec Bunsen ou de la lampe à alcool. Ce procédé déforme légèrement les cellules et ne convient pas, en particulier, dans la confection des préparations de sang.

b). *Alcool-éther*. — Verser sur la lamelle deux ou trois gouttes d'alcool-éther (Voy. p. 144). Laisser sécher à l'air. Ce procédé fixe très rigoureusement les éléments cellulaires dans leur forme; d'une façon générale, il est préférable au précédent.

Après la fixation les lamelles peuvent subir l'action des réactifs colorants.

II. **Pulpes**. — On en prépare des *frottis* de la façon suivante :

1° Avec l'öse ou l'extrémité d'une pipette, porter sur une lame une petite quantité de la pulpe et l'y étaler par frottement en donnant au frottis la forme d'un rectangle de 15 à 20 millimètres de côté.

On pourrait encore prendre, avec une pince à dissection, un fragment de l'organe à examiner (rate, foie, etc.) et en frotter légèrement une partie de la surface de la lame.

Le frottis doit être mince et uniforme, ne pas présenter d'irrégularités ni de grumeaux qui gêneraient ensuite l'application de la lamelle ;

2° Sécher, comme plus haut ;

3° Fixer par l'alcool-éther ou par la chaleur ; le frottis peut dès lors être coloré.

Les frottis préparés avec la pulpe cérébrale ou médullaire doivent toujours, après la fixation, être lavés à plusieurs reprises avec l'alcool-éther pour les débarrasser de la matière grasse qui gênerait les colorations.

III. **Crachats**. — Quand les crachats sont fluides on les traite comme les liquides ; s'ils sont concrets, résistants, on les étale à la surface de la lamelle en se servant de l'öse; on facilite, dans ce dernier cas, la formation d'un frottis mince et régulier en chauffant légèrement la lamelle de manière à obtenir la dessiccation du crachat en même temps qu'on l'étale. Fixer après dessiccation.

B. — COLORATION.

Une lamelle, un frottis, renferment des éléments de deux sortes :

1° Un *fond*, constitué par des cellules et des éléments amorphes, d'origine animale ;

2° Des *microbes*, cellules végétales.

Dans les recherches bactériologiques on soumet les lamelles et les frottis à deux méthodes de coloration :

a) La *coloration simple*, qui colore de la même façon le fond et les microbes ;

b) La *double coloration* ou *différenciation*, qui permet de conférer aux microbes une teinte différente de celle du fond.

I. — COLORATION SIMPLE.

La coloration simple d'un frottis ou d'une lamelle de sang peut être obtenue à l'aide d'une des solutions colorantes indiquées au chapitre VIII.

D'une façon générale, la solution dont l'usage est le plus recommandable est la *thionine phéniquée* (p. 140). On procédera de la façon suivante :

1° La lamelle étant maintenue par un angle avec la pince de Cornet, verser sur sa face enduite, de manière à la recouvrir complètement, une grosse goutte de thionine phéniquée.

Laisser en contact trente à soixante secondes.

2° Laver à l'eau distillée.

3° Porter la lamelle sur une lame, la face enduite regardant la lame. Examiner au microscope dans l'eau.

4° Si la préparation est bonne et que l'on veuille la conserver, il est nécessaire de la monter. Pour cela, sécher la lamelle à l'air libre ou à une douce chaleur, puis en poser la face enduite sur une goutte de baume de Canada placée sur une lame.

En résumé :

Colorer, laver à l'eau, sécher, monter au baume.

Les préparations colorées doivent être examinées avec l'objectif à immersion.

On opérerait d'une façon analogue pour la coloration des frottis sur lame. La lame étant tenue avec la main gauche, verser sur le frottis une goutte de solution colorante ; laver à l'eau ; sécher ; monter en déposant une goutte de baume sur le frottis, puis en recouvrant d'une lamelle.

Dans les examens extemporanés, on peut se dispenser de recouvrir le frottis avec une lamelle. Après avoir lavé à l'eau, on sèche, puis on dépose sur le frottis une goutte d'huile de cèdre et on examine directement avec l'objectif à immersion sans interposer de lamelle.

Outre la thionine phéniquée, on devra employer, dans certains cas, les violets phéniqués, les bleus de Kühne, de Löffler, de Roux, la fuchsine de Ziehl diluée, etc. Lorsque nous étudierons chaque microbe en particulier, nous indiquerons les solutions colorantes qui conviennent le mieux à la recherche et à l'étude des différentes espèces.



Fig. 120 *bis*. — Charbon symptomatique. — Frottis de muscle. Coloration simple (fuchsine de Ziehl diluée) (Reich. Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

La méthode de la coloration simple a l'inconvénient de donner une même teinte au fond et aux microbes (fig. 120 *bis*), ce qui rend souvent ceux-ci peu visibles, surtout quand ils sont peu nombreux et que le frottis est épais. Pour remédier à cet inconvénient on a recours aux méthodes de différenciation.

Particularités de l'examen du sang. — Dans la coloration des lamelles de sang, on peut se débarrasser facilement du fond et éviter d'avoir recours à la différenciation. Dans les globules rouges, l'hémoglobine seule fixe les matières colorantes : en dissolvant préalablement cette hémoglobine on obtient, après action de la solution colorante, un fond incolore sur lequel se détachent vigoureusement les microbes. Pour obtenir ce résultat on traite les lamelles par un des deux procédés suivants :

a) **Procédé de Gunther.** — 1° Déposer sur la lamelle, desséchée à une douce chaleur et non passée à la flamme, une forte goutte d'eau acétisée à 5 p. 100. Laisser en contact pendant trente secondes.

2° Exposer la lamelle pendant quelques secondes aux vapeurs d'ammoniaque.

3° Laver à l'eau.

4° Colorer, laver, sécher, monter.

b) **Procédé de Vincent.** — 1° Déposer sur la lamelle desséchée à une douce chaleur et non flambée une goutte du liquide suivant :

Solution aqueuse d'acide phénique à 5 p. 100.	6	centimètres cubes.
— — saturée de sel marin........	30	—
Glycérine pure...........................	30	—

Laisser en contact une à deux minutes.

2° Laver à l'eau ; colorer, etc.

c) Enfin, la coloration simple au bleu de Löffler permet d'obtenir de belles préparations de sang ; elle donne immédiatement une différenciation nette en colorant les globules rouges en vert pâle et les microbes en bleu foncé.

II. — DIFFÉRENCIATION.

La double coloration d'une préparation est très aisément obtenue quand on se trouve en présence de microbes se colorant par la méthode de Gram ; mais quand la bactérie à étudier ne prend pas le Gram on est obligé d'avoir recours à des procédés plus délicats et qui donnent souvent des résultats moins satisfaisants. Enfin l'étude et la recherche de certains microbes, tels que les bacilles de la tuberculose et de la lèpre, exigent l'emploi de méthodes de coloration spéciales dont le type est la méthode d'Erlich.

A. **Méthode de Gram.** — La méthode décrite par Gram a subi de nombreuses modifications dont nous passerons en revue les plus importantes ; mais nous tenons à mettre en garde l'expérimentateur et particulièrement le débutant contre les dangers qu'il y a à utiliser un trop grand nombre de procédés ; on s'expose ainsi à des erreurs et à des insuccès qui découragent vite même les plus opiniâtres ; il est indispensable de posséder à fond un procédé que l'on puisse employer en toute sécurité : nous recommandons spécialement celui que nous décrivons en *b*.

a **Procédé de Gram.** — 1° Déposer sur la face enduite de la lame ou de la lamelle une grosse goutte de violet de gentiane aniliné (p. 141). Laisser en contact deux à quatre minutes.

2° Rejeter la solution colorante et la remplacer, sans lavage préalable, par quelques gouttes de la solution iodée de Gram. Laisser en contact une à deux minutes, jusqu'à ce que la préparation prenne une teinte noirâtre.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer avec l'alcool absolu en prenant les précautions recommandées page 146.

5° Laver à l'eau distillée.

6° Déposer sur la préparation une forte goutte de solution aqueuse d'éosine :

Éosine soluble à l'eau........................	1 gramme.
Eau distillée................................	100 centimètres cubes.

Laisser en contact une à deux minutes.

7° Laver, sécher, monter au baume.

Avant le montage la préparation peut être examinée dans l'eau ; on pourra ensuite l'éclaircir, après dessiccation, par l'essence de girofles et le xylol.

Dans la préparation ainsi obtenue le fond est coloré en rose, les microbes en violet. La décoloration doit être poussée jusqu'à ce que le fond ne présente aucune teinte violette.

Les lamelles de sang, traitées par la méthode de Gram, donnent de très jolies préparations. Quand on observe du sang d'oiseau, on peut ne pas laisser agir l'alcool jusqu'à décoloration complète du fond ; on s'arrête quand les noyaux seuls des globules rouges restent violets ; après action de l'éosine, le protoplasma des hématies devient rose tandis que leur noyau et les microbes sont colorés en violet.

b) **Procédé recommandé.** — Nous avons insisté, au chapitre VIII, sur les inconvénients de l'emploi de la solution de violet de gentiane aniliné, on lui préférera le krystal violet phéniqué.

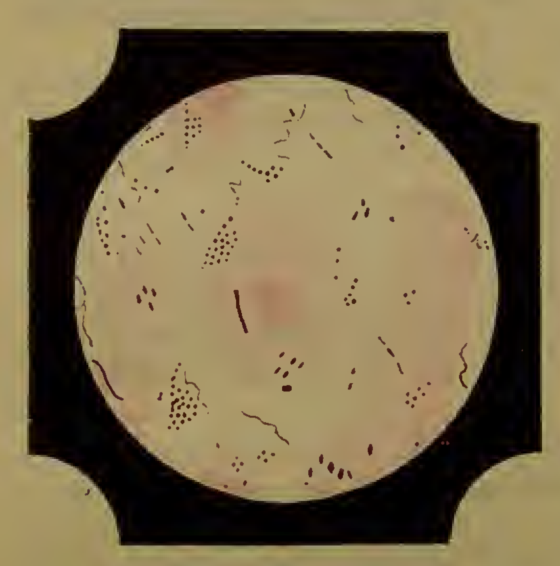


Fig. 121. — Frottis préparé avec du mucus buccal. — Bactéries diverses. — Coloration par la méthode de Gram ; fond teinté à l'éosine (Reich. Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

1° Déposer sur la face enduite de la lame ou de la lamelle une grosse goutte de krystal violet phéniqué (p. 139). Laisser en contact quinze à trente secondes.

2° Remplacer, sans lavage préalable, la solution colorante par la liqueur iodée de Gram ; laisser en contact une à deux minutes.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool absolu.

On peut accélérer la décoloration en lavant d'abord à l'alcool absolu, puis à l'huile d'aniline et en terminant par l'alcool absolu. L'huile d'aniline est un décolorant très énergique, très brutal, et ne doit rester que quelques secondes en contact avec la préparation.

5° Laver à l'eau.

6° Colorer le fond à l'éosine aqueuse, comme plus haut.

7° Laver ; sécher et monter après éclaircissement facultatif à l'essence de girofles et au xylol.

c) **Procédé de Nicolle.** — 1° Colorer au violet de gentiane phéniqué (p. 139) pendant quatre à six secondes.

2° Remplacer, sans lavage préalable, la solution colorante par le iquide de Gram modifié :

Iode..	1 gramme.
Iodure de potassium........................	2 —
Eau distillée...............................	200 centimètres cubes.

Laisser en contact quatre à six secondes en renouvelant une ou eux fois le liquide à la surface de la préparation.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool-acétone au tiers.

Alcool absolu....................................	2 parties.
Acétone...	1 —

5° Laver à l'eau distillée.

6° Colorer le fond avec la solution alcoolique d'éosine.

Solution saturée d'éosine dans l'alcool à 95°............	1 volume.
Alcool à 95°..	2 —

7° Laver, sécher et monter dans le baume.

d) **Procédé de Mérieux.** — 1° Colorer par le violet phéniqué omme en *c*.

2° Faire agir pendant quatre à six secondes en renouvelant une deux fois le liquide, la solution suivante :

Iode..	1 gramme.
Iodure de potassium........................	2 —
Solution saturée d'éosine dans l'alcool à 50°.	20 centimètres cubes.
Eau distillée...............................	200 —

3° Laver à l'eau distillée.

4° Décolorer par l'alcool acétone au sixième :

Alcool absolu....................................	5 volumes.
Acétone...	1 —

5° Sécher, monter au baume.

Ce procédé ne nous a jamais donné de préparations aussi nettes ie celles que nous obtenons par les procédés *a*, *b*, *c*.

e) **Procédé de Kühne.** — 1° Colorer pendant plusieurs minutes ec le bleu de Kühne (p. 140) ou le bleu ammoniacal (p. 141).

2° Laver à l'eau distillée.

3° Faire agir la solution iodée de Gram pendant deux à trois inutes.

4° Laver à l'eau distillée.

5° Décolorer avec une solution saturée de fluorescéine dans l'alcool absolu.

6° Quand la teinte bleue du fond a disparu, laver à l'alcool absolu, puis à l'essence de girofles, au xylol, et monter dans le baume de Canada.

Les bactéries apparaissent en violet sur le fond légèrement teinté par la fluorescéine. Les procédés précédents nous paraissent préférables.

B. **Méthode de Claudius.** — La méthode de Claudius, telle que nous l'avons décrite page 144, s'applique à la coloration des frottis.

C. **Méthodes pour les microbes se décolorant par le Gram.** — α. *Sang.* — Pour la coloration des lamelles de sang contenant des microbes décolorables par la méthode de Gram, on utilise la propriété que possèdent les hématies de fixer énergiquement l'éosine, tandis que les bactéries ont une électivité marquée pour les couleurs basiques d'aniline.

a) **Procédé recommandé** (Laveran). — 1° Déposer sur la lamelle une forte goutte de la solution aqueuse d'éosine (p. 212). Laisser en contact trente à soixante secondes.

2° Remplacer l'éosine par une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène ; laisser agir environ trente secondes.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Sécher ; monter dans le baume.

Les hématies sont colorées en rose ; les bactéries et les noyaux des globules blancs, en bleu. Avec le sang d'oiseau les noyaux des hématies sont également bleus.

b) **Procédé de Chenzinsky.** — 1° Déposer la lamelle, la face enduite regardant en bas, dans un petit cristallisoir à couvercle rodé contenant une petite quantité de la solution suivante, récemment préparée :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène.	40	centimètres cubes.
Solution à 1/2 p. 100 d'éosine soluble à l'eau dans l'alcool à 70°.	20	—
Eau distillée	40	—

Porter le cristallisoir dans l'étuve à 37° ; faire durer le contact trois à six heures.

2° Au sortir du bain colorant, laver la lamelle dans l'eau distillée. sècher et monter au baume.

c) **Procédé de Romanowsky.** — 1° Après dessiccation et fixation dans

la flamme porter la lamelle, pendant environ une heure, dans l'étuve sèche à 105°-110°.

2° Plonger la lamelle dans le bain suivant, récemment préparé :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène..........	2 parties.
— — d'éosine à 1 p. 100....................	5 —

Laisser en contact pendant une à dix heures.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Sécher, monter au baume.

β. *Frottis, lamelles de pus, etc.* — *a*) **Procédé de Kühne**. — 1° Colorer pendant quelques minutes avec le bleu phéniqué (p. 140).

2° Laver à l'eau.

3° Laver à l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à obtention d'une teinte bleu pâle.

Acide chlorhydrique dilué.

Acide chlorhydrique pur....................	1 centimètre cube.
Eau distillée..............................	1000 —

4° Enlever de suite l'excès d'acide par un lavage avec la solution lithinée :

Solution aqueuse saturée de carbonate de lithine..................................	5 centimètres cubes.
Eau distillée..............................	100 —

5° Laver à grande eau.

6° Sécher, éclaircir par l'essence de girofles, le xylol et monter dans le baume.

Le fond est coloré en bleu très pâle, les microbes en bleu foncé.

b) **Procédé de Nicolle. — Procédé recommandé.** — 1° Colorer pendant quelques minutes avec le bleu phéniqué (p. 140).

2° Laver à l'eau.

3° Déposer sur la préparation quelques gouttes de la solution suivante :

Tanin pur..	10 grammes.
Eau distillée....................................	100 —

Laisser en contact deux à trois secondes.

4° Laver à l'eau.

5° Traiter rapidement par l'alcool absolu, l'essence de girofles et le xylol.

6° Monter dans le baume.

Le fond est bleu violacé très pâle, les bacilles sont colorés en bleu foncé.

D. **Méthodes spéciales.** — Les méthodes particulières dont l'emploi est obligatoire pour la recherche et l'étude des bacilles de la tuberculose, de la lèpre, etc., seront étudiées en détail dans le chapitre consacré au bacille de Koch.

COUPES.

Quand on se propose de rechercher des bactéries dans un tissu il est nécessaire de préparer des coupes très fines qui seront soumises à l'action des agents colorants.

L'obtention de coupes fines est la condition indispensable du succès ; les coupes pratiquées à la main sont inutilisables pour les recherches bactériologiques et l'on doit recourir aux *microtomes* mécaniques dont l'emploi exige l'*inclusion* préalable de l'objet à couper.

Les inclusions à la gomme, à la cire, au savon, à la celloïdine et au collodion, employés en histologie, ne permettent pas d'obtenir des coupes assez minces. Restent deux procédés : la congélation et l'inclusion à la paraffine.

Nous n'insisterons pas sur le premier de ces procédés : la congélation par l'éther ou le chlorure de méthyle, employée assez fréquemment dans les laboratoires allemands, est rarement usitée en France et donne d'ailleurs des résultats beaucoup moins satisfaisants que l'inclusion dans la paraffine. Nous ne décrirons que ce dernier procédé.

Microtomes. — La plupart des microtomes mécaniques peuvent convenir à la confection des coupes bactériologiques ; le modèle Rocking, construit par Dumaige, celui de Malassez, construit par Verick, ceux de Miehe, de Minot, etc., seront ordinairement utilisés.

Nous ne pouvons insister sur le fonctionnement de ces divers appareils ; il suffira d'en avoir un modèle entre les mains pour se rendre compte de son mécanisme.

Rappelons que les microtomes, véritables instruments de précision, doivent être maniés avec le plus grand soin ; l'appareil doit être nettoyé avec soin toutes les fois qu'on en aura fait usage, et il sera conservé à l'abri des poussières et de l'humidité sous une cloche de verre ou dans une caisse en bois.

Rasoirs. — Un bon rasoir est indispensable pour la réussite des coupes. Le rasoir doit avoir une face plane (face inférieure) ; il

aura assez de tranchant pour couper un cheveu maintenu entre le pouce et l'index ou un poil du dos de la main.

Avant chaque opération, le rasoir doit être passé sur le cuir (d'abord sur la face munie de pâte, puis sur la face sèche) en ayant soin d'observer les règles ordinaires : le rasoir est repassé, le dos en avant et toujours en allant du talon vers l'extrémité de la lame ; on passe alternativement chaque face de la lame en tournant toujours sur le dos.

Il est bon également de savoir passer le rasoir sur la pierre ; on évitera aussi d'envoyer fréquemment l'instrument au coutelier et l'on s'en trouvera beaucoup mieux. Le repassage à la pierre doit être pratiqué le tranchant en avant et en allant toujours du talon vers l'extrémité ; la pierre ne sera pas huilée, mais simplement mouillée avec de l'eau simple ou mieux avec le liquide suivant :

Eau distillée	50	centimètres cubes.
Alcool à 95°	50	—
Glycérine	50	—

Après chaque opération le rasoir doit être essuyé avec un linge fin, passé sur le cuir et replacé dans son étui.

Pour couper les objets inclus dans la paraffine la lame du rasoir doit être sèche et aborder obliquement l'objet à couper. Les coupes sont recueillies sur le rasoir avec un fin pinceau ou un morceau de papier de soie, mais jamais avec un corps dur (tel qu'une aiguille, un scalpel) qui pourrait endommager le tranchant de l'instrument.

I. — INCLUSIONS A LA PARAFFINE.

A. **Procédé à l'éther.** — *Procédé recommandé.* — Les pièces à couper, fixées et durcies suivant une des méthodes que nous avons indiquées au chapitre précédent, sont, au sortir de l'alcool absolu, traitées de la façon suivante :

1° Immersion dans l'alcool-éther pendant vingt-quatre heures;

2° Immersion dans l'éther pendant douze à vingt-quatre heures ;

3° Immersion pendant vingt-quatre heures, dans l'étuve à 37°, dans de l'éther saturé de paraffine molle (fusible à 45°) ;

4° Immersion pendant douze à vingt-quatre heures dans de la paraffine molle liquéfiée, dans l'étuve à 45°.

Ces différentes immersions seront faites dans de petits flacons, à large ouverture et exactement bouchés ; au sortir d'un bain l'objet à inclure est immédiatement plongé dans le suivant. La paraffine molle doit se maintenir absolument liquide à 45° ; on trouve aujourd'hui très aisément cette paraffine dans le commerce.

5° Au sortir de l'étuve, les pièces sont retirées de la paraffine avant que celle-ci ne soit solidifiée : on les laisse refroidir à l'air et quand elles sont devenues dures on les enrobe de la façon suivante :

On choisit un bouchon cylindrique entrant aisément dans la pince du microtome. Autour du bouchon on enroule une bandelette de papier filtre maintenue par une épingle fixée dans le liège, de manière à déterminer un petit cylindre creux de deux à trois centimètres de hauteur et dont le fond est constitué par la face supérieure du bouchon ; il est bon d'avoir, au préalable, pratiqué, avec un scalpel, quelques cannelures sur cette face du bouchon pour en augmenter l'adhérence avec la paraffine. Avec un pinceau on huile soigneusement la face interne de la bandelette de papier en évitant de porter de l'huile sur le liège qui constitue le fond du cylindre.

La pièce à couper étant maintenue convenablement orientée dans le moule, à l'aide d'une aiguille emmanchée, on verse autour d'elle de la paraffine dure (fusible à 52°-54°) fondue dans une capsule en porcelaine et qu'on a laissé refroidir jusqu'à formation d'une pellicule à la surface ; on remplit le moule de paraffine en ayant soin que cette substance dépasse de plusieurs millimètres en hauteur la pièce à inclure, à cause de la rétraction considérable qu'elle subit en se solidifiant.

Dès que la paraffine commence à se solidifier, on retire l'aiguille qui maintenait la pièce et on abandonne le moule jusqu'à complet refroidissement.

Lorsque la solidification de la paraffine est complète on enlève l'épingle et on déroule la bandelette de papier : on obtient ainsi, adhérent au bouchon, un cylindre de paraffine dans lequel est incluse la pièce à couper. Après que la surface de la paraffine a été égalisée avec un scalpel, l'on fixe le bouchon dans la pince du microtome et l'on peut pratiquer les coupes.

B. **Procédé au xylol.** — 1° Au sortir de l'alcool absolu les pièces sont portées dans le xylol pendant une dizaine d'heures.

2° Les pièces sont ensuite maintenues pendant six à douze heures dans une solution saturée de paraffine molle dans le xylol, à la température de 37°.

3° Immerger pendant le même temps la pièce dans de la paraffine molle, dans l'étuve à 45°.

4° Au sortir de la paraffine molle la pièce est montée, comme nous l'avons exposé précédemment, dans de la paraffine dure.

II. — TRAITEMENT PRÉLIMINAIRE DES COUPES.

Les coupes obtenues par l'un des procédés que nous venons de décrire ne peuvent être traitées par les réactifs colorants qu'après avoir été débarrassées de la paraffine qui les imbibe.

A. **Procédé recommandé.** — 1° Aussitôt faites, les coupes sont portées dans un cristallisoir à couvercle rodé contenant de l'éther; l'éther dissout la paraffine assez rapidement; la durée de l'immersion dans l'éther varie de plusieurs minutes à quelques heures, selon les dimensions et le nombre des coupes traitées.

2° Quand les coupes sont débarrassées de la paraffine, on les porte avec une spatule de platine ou de nickel dans un second cristallisoir contenant de l'alcool absolu.

3° Après quelques minutes d'immersion dans l'alcool les coupes sont transportées une à une, avec la spatule, dans un cristallisoir plein d'eau distillée; au moment du contact de l'eau, les coupes présentent un mouvement giratoire très vif, qui les déroule et les étale.

Quand les coupes sont fines et fragiles, la brusquerie de ce mouvement giratoire peut les casser et les rendre inutilisables; il est bon dans ce cas de porter les coupes, au sortir de l'alcool absolu, dans de l'alcool à 70°, puis dans de l'alcool à 36°, et enfin, seulement, dans l'eau distillée.

4° Pour transporter une coupe sur la lame porte-objet, on plonge cette lame obliquement dans l'eau où se trouvent les coupes, on entraîne une de celles-ci avec une aiguille jusqu'au niveau du milieu de la lame, avec l'aiguille on fixe contre la lame l'angle supérieur de la coupe et on sort doucement la lame de l'eau : la coupe s'étale d'elle-même. Il ne reste plus qu'à enlever l'eau qui couvre la lame avec un peu de papier à cigarettes ou de papier de soie découpé en petits rectangles (et non déchiré, pour éviter la présence de barbes qui pourraient accrocher et entraîner la coupe) et la coupe est prête à subir la coloration.

B. **Fixation à l'albumine.** — Le procédé précédent suffit dans tous les cas entre des mains expérimentées; mais quand les coupes sont très délicates (poumon, p. ex.), elles sont exposées à se déchirer pendant les manipulations qu'il exige. Il faut alors, aussitôt la coupe pratiquée, la fixer, *ne varietur*, sur la lame porte-objet. Le mode de fixation le plus ordinairement employé en bactériologie est celui qui utilise l'albumine de Mayer.

Albumine de Mayer. — Battre deux blancs d'œuf en neige; laisser déposer, filtrer sur papier et ajouter au liquide clair obtenu son vo-

lume de glycérine. Conserver dans un flacon bien bouché dans lequel on place un petit fragment de camphre ou de thymol pour empêcher la putréfaction. Au moment de l'usage, rétablir par agitation l'homogénéité du liquide.

Mode d'emploi. — Dès que la coupe est pratiquée on la porte avec la spatule sur une couche mince d'albumine déposée sur la lame (une gouttelette d'albumine a été placée sur la lame, puis étalée en couche très fine avec la pulpe de l'index). Avec le pinceau on étale la coupe avec soin de façon qu'elle ne fasse pas de plis, puis on exerce une légère pression pour la faire adhérer à l'albumine.

Si les coupes ne s'étalaient pas, on disposerait à la surface de la lame enduite d'albumine une gouttelette d'eau, on placerait la coupe sur cette goutte d'eau, puis on chaufferait très légèrement sur la platine chauffante de manière que la coupe s'étale ; ce résultat obtenu on enlèverait l'excès d'eau avec le papier de soie et on continuerait l'opération comme ci-dessous.

On chauffe alors très légèrement sur la veilleuse du bec Bunsen la face libre de la lame porte-objet, en quelques secondes la coupe devient adhérente au verre. Reste à la débarrasser de la paraffine, pour cela on la traite par le xylol, puis par l'alcool absolu; on peut alors lui faire subir l'action des matières colorantes.

Ce procédé a l'inconvénient de ne pouvoir être employé quand on doit traiter la coupe par un certain nombre de réactifs, qui, tels que les solutions alcalines, le picro-carmin de Orth, etc., ont la propriété de dissoudre l'albumine.

III. — COLORATION DES COUPES.

Le but des coupes bactériologiques est de permettre la mise en évidence, au moyen des réactifs colorants, des microbes contenus dans les tissus. Il importe, au premier chef, que les microbes présentent une coloration différente de celle du tissu animal, ce qui rend leur recherche et leur étude beaucoup plus aisées : les méthodes de double et de triple colorations sont les procédés de choix ; malheureusement ces méthodes ne sont pas applicables à un grand nombre de microbes qui ne résistent pas au Gram et ne se colorent pas par les procédés d'Ehrlich et de Ziehl. On est forcé alors de se contenter d'une simple différenciation qui permet d'abaisser la teinte du fond (cellules animales) tout en conservant une coloration intense au microbe (cellule végétale).

Nous étudierons dans ce chapitre les méthodes de simple coloration et de colorations double ou triple par la méthode de Gram et ses

dérivés; nous reporterons au chapitre de la Tuberculose l'étude des procédés de Ziehl et d'Ehrlich.

A. — SIMPLE COLORATION.

PROCÉDÉS APPLICABLES A LA GÉNÉRALITÉ DES MICROBES.

a) **Procédé de Weigert.** — 1° Déposer sur la coupe quelques gouttes de violet de gentiane aniliné (p. 141). Laisser en contact environ trente minutes; enlever avec du papier de soie l'excès de colorant.

2° Plonger la coupe pendant quelques secondes dans un cristallisoir contenant une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p. 200.

3° Porter la coupe dans l'eau distillée, la laver avec soin; la reprendre sur la lame; enlever l'excès d'eau avec du papier de soie.

4° Déshydrater très rapidement par l'alcool absolu.

5° Éclaircir avec l'essence de girofles, puis le xylol.

6° Monter dans le baume de Canada.

b) **Procédé de Löffler.** — Opérer comme précédemment en colorant la coupe (temps 1) dans le bleu alcalin de Löffler (p. 141) pendant environ quinze minutes.

On peut encore remplacer le bleu alcalin par la solution de fuchsine de Ziehl (p. 139) qu'on fait agir pendant cinq à six minutes.

c) **Procédé de Kühne** (I). — 1° Colorer pendant quinze minutes avec le bleu phéniqué ou le bleu ammoniacal (p. 141).

2° Porter la coupe dans l'eau distillée.

3° Porter la coupe pendant quelques secondes dans l'acide chlorhydrique dilué (p. 215).

4° Porter rapidement la coupe dans la solution lithinée (p. 215).

5° Reporter dans l'eau distillée, laver avec soin la coupe, la reprendre sur la lame, enlever l'excès d'eau avec le papier de soie et laisser la coupe se dessécher, à l'air libre, presque complètement.

6° Déshydrater *très rapidement* par l'alcool absolu.

7° Éclaircir par l'essence de girofles et le xylol.

8° Monter dans le baume.

d) **Procédé de Kühne** (II). — 1° Colorer au bleu phéniqué (p. 141) pendant environ trente minutes;

2° Laver dans l'eau distillée.

3° Traiter par l'acide chlorhydrique dilué (p. 215) jusqu'à coloration bleu pâle.

4° Laver dans la solution lithinée (p. 215).

5° Laver plusieurs minutes dans l'eau distillée; reprendre la coupe sur la lame, enlever l'excès d'eau avec le papier de soie.

6° Déshydrater très rapidement par l'alcool absolu légèrement teinté par le bleu de méthylène.

7° Remplacer l'alcool par de l'huile d'aniline également teintée en bleu ; laisser au contact environ deux minutes.

8° Remplacer l'huile teintée par de l'huile d'aniline ordinaire ; laisser en contact une à deux minutes.

9° Éclaircir par l'essence de girofles et le xylol ; remplacer deux fois le xylol pour enlever toute trace d'huile d'aniline.

10° Monter dans le baume.

Cette méthode, très laborieuse, ne colore qu'un nombre restreint de microbes ; nous ne saurions en conseiller l'emploi.

e) **Procédé à la thionine. — Procédé recommandé.** — 1° Colorer avec la thionine phéniquée (p. 140), laisser en contact environ une minute.

2° Porter la coupe dans l'eau distillée, la reprendre sur la lamelle, enlever l'excès d'eau avec le papier de soie.

3° Déshydrater très rapidement par l'alcool absolu.

4° Éclaircir par l'essence de girofles et le xylol.

5° Monter dans le baume.

f) **Procédé de Gram pour le bacille typhique.** — 1° Colorer pendant quelques heures dans le violet de gentiane aniliné (p. 141).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Placer la coupe pendant une minute dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 p. 100.

4° Reporter la coupe dans l'eau distillée, la laver avec soin, la reprendre sur la lame, enlever l'excès d'eau.

5° Déshydrater très rapidement par l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofles et au xylol.

7° Monter dans le baume de Canada.

Les bacilles restent seuls colorés.

g) **Procédé au tanin de Nicolle. — Procédé recommandé.** — S'applique à l'étude du bacille typhique.

1° Colorer la coupe pendant deux à trois minutes au bleu de Löffler ou de Kühne (p. 140 et 141).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Traiter pendant quelques secondes par une solution aqueuse de tanin à 1/10.

4° Porter la coupe dans l'eau distillée, la reprendre sur la lame ; essuyer l'excès d'eau.

5° Déshydrater par l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofles et au xylol.

7° Monter dans le baume.

B. — DOUBLE ET TRIPLE COLORATIONS.

PROCÉDÉS APPLICABLES AUX MICROBES PRENANT LE GRAM.

Quand on veut colorer une coupe où se trouvent des microbes prenant le Gram, on commence par teinter le fond (cellules animales) avec une couleur acide ayant peu d'affinité pour les microbes; puis on traite la coupe par le procédé de Gram : les seuls microbes se colorent en violet et se détachent vivement sur le fond.

La coloration du fond peut être obtenue à l'aide de différentes solutions.

Pour les doubles colorations on emploie fréquemment l'éosine, la fluorescéine, le carmin (carmin de Orth), la vésuvine, l'hématoxyline de Bœhmer, le jaune aurantia, l'hématéine, etc.

La triple coloration utilise une solution colorante à élections, teintant différemment les divers tissus; on peut ainsi étudier les lésions liées à la présence des microbes dans les organes; on emploie d'ordinaire le picro-carmin de Orth ou l'hématoxyline alliée au jaune aurantia, à l'éosine, etc. Voici les formules des colorants de fond les plus usités :

Solution aqueuse faible d'éosine.

Éosine soluble à l'eau	0gr,50
Eau distillée	300 à 400 centimètres cubes.

Filtrer.

On préparerait de même les solutions de fluorescéine, de vésuvine, le jaune aurantia, etc.

Hématoxyline de Bœhmer.

Préparer les deux solutions suivantes :

a. Hématoxyline cristallisée	1 gramme.
Alcool absolu	10 centimètres cubes.

Placer dans un flacon bien bouché.

b. Alun de potasse	20 grammes.
Eau distillée	200 centimètres cubes.

Faire dissoudre à chaud et filtrer après refroidissement.

Au bout de vingt-quatre heures mélanger les solutions *a* et *b*; abandonner huit jours le mélange à l'air libre, puis le conserver dans un flacon bouché et filtrer au moment du besoin.

Hématéine.

Préparer les deux solutions suivantes :

a.	Hématéine	1 gramme.
	Alcool absolu	50 centimètres cubes.
b.	Alun de potasse	50 grammes.
	Eau distillée	1000 centimètres cubes.

Faire dissoudre à chaud.

Mélanger à chaud les deux solutions ; laisser refroidir à l'air ; filtrer.

Carmin de Orth.

Solution aqueuse saturée de carbonate de lithine	100 centimètres cubes.
Carmin n° 40	2gr,50

Faire dissoudre à froid.

Carmin de Orth alcoolisé.

Carmin de Orth	5 volumes.
Alcool à 95°	1 —

Mélanger. S'emploie exclusivement pour la coloration des coupes fixées sur la lame avec l'albumine de Mayer, le carmin de Orth ordinaire dissolvant l'albumine.

Picrocarmin de Orth.

Mélanger :

Carmin de Orth	1 volume.
Eau picriquée saturée	1 à 2 —

Au sortir du picrocarmin les coupes doivent être portées dans le liquide fixateur suivant :

Alcool absolu	70 centimètres cubes.
Eau picriquée saturée	30 —
Acide chlorhydrique pur	0gr,5

I. **Double coloration.** — A. **Procédé recommandé.** — 1° Traiter la coupe par la solution faible d'éosine (p. 223) jusqu'à ce qu'elle présente une coloration rose (environ trente secondes).

2° Laver dans l'eau distillée.

3° Traiter la coupe sur la lame, pendant dix à trente secondes, par le krystal violet phéniqué ; la coupe prend une teinte violette.

4° Remplacer la solution colorante par le liquide de Gram, qu'on laisse agir pendant environ trente secondes, en le renouvelant deux

trois fois, jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte noirâtre.

5° Traiter par l'alcool absolu (ou l'alcool absolu et l'huile d'aniline) jusqu'à ce que la teinte rose du fond ait reparu.

6° Éclaircir par l'essence de girofles et le xylol.

7° Monter dans le baume.

Le fond est rose, les microbes résistants au Gram restent seuls colorés en violet.

B. **Procédé de Kühne.** — 1° Colorer la coupe pendant cinq à quinze minutes dans le bleu de Kühne ou le bleu ammoniacal (p. 140 et 141).

2° Laver la coupe dans l'eau distillée.

3° Faire agir sur la coupe la solution de Gram pendant deux à trois minutes.

4° Laver à l'eau distillée.

5° Décolorer avec la solution saturée de fluorescéine dans l'alcool absolu.

6° Traiter par l'alcool absolu pur, l'essence de girofles et le xylol.

7° Monter dans le baume.

Les microbes sont violets; le fond est à peine teinté par la fluorescéine.

III. **Triple coloration.** — A. **Procédé recommandé.** — 1° Traiter pendant environ cinq minutes par le picro-carmin de Orth.

2° Remplacer le picro-carmin par le liquide fixateur; laisser agir environ trente secondes.

3° Laver dans l'eau distillée.

4° Colorer pendant dix à trente secondes par le krystalviolet phéniqué.

5° Remplacer la solution colorante par le liquide de Gram, le laisser agir pendant environ trente secondes.

6° Décolorer par l'alcool absolu ou l'alcool absolu et l'huile d'aniline.

7° Faire agir successivement l'alcool absolu picriqué, l'essence de girofles et le xylol.

8° Monter dans le baume.

B. **Procédé de Nicolle.** — S'applique à la coloration des coupes collées sur la lame avec l'albumine de Mayer.

1° Faire agir sur la coupe le carmin de Orth alcoolisé (p. 224) pendant quinze minutes.

2° Laver à l'eau distillée.

3° Faire agir le violet de gentiane phéniqué (p. 140) pendant quatre à six secondes.

4° Remplacer le violet de gentiane par du Gram fort (p. 213) que l'on renouvelle deux fois pendant quatre à six secondes.

5° Décolorer par l'alcool-acétone au tiers (p. 213).

6° Faire agir quelques instants de l'alcool absolu picriqué.

7° Éclaircir à l'essence de girofles et au xylol.

8° Monter au baume.

C. **Procédé de Claudius**.

1° Fixer la coupe sur la lame avec l'albumine de Mayer.

2° Colorer pendant dix à quinze minutes avec le carmin de Orth alcoolisé (p. 224).

3° Laver à l'eau distillée.

4° Colorer pendant deux minutes avec la solution aqueuse à 1 p. 100 de violet de méthyle 6B ou le violet de gentiane phéniqué.

5° Faire agir pendant deux minutes la solution picriquée (p. 147).

6° Enlever avec soin la solution picriquée avec un morceau de papier-filtre et déposer sur la coupe une grosse goutte de chloroforme. Absorber le chloroforme avec un papier filtre, et le remplacer par une goutte d'essence de girofles ; recommencer de même jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte rose.

7° Éclaircir au xylol, monter dans le baume.

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUE SPÉCIALE

CHAPITRE PREMIER

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

La bactéridie charbonneuse est l'agent du charbon de l'homme et es animaux (pustule maligne, charbon intestinal, charbon pulmoaire de l'homme ; fièvre charbonneuse du cheval ; sang de rate du iouton ; maladie du sang de la vache).

L'homme contracte d'ordinaire le charbon par inoculation cutanée, la faveur d'une solution de continuité du tégument, en maniant ›s viandes ou des peaux d'animaux morts du charbon ; l'inoculation ır les voies digestives, par ingestion de viandes charbonneuses, est ıre; plus fréquente est l'infection par les voies respiratoires à la ıveur de poussières chargées de spores charbonneuses (maladie des ieurs de laine, maladie de Bradford).

Les animaux domestiques contractent d'ordinaire le charbon par voie digestive en avalant des aliments souillés par des spores.

Ces spores proviennent du sol où elles se forment à l'intérieur des bacridies contenues dans le sang des cadavres charbonneux; quand les davres sont enterrés, les spores sont remontées à la surface dans les jections des vers de terre et, délayées par la pluie, elles se répandent ır les herbes qui couvrent le sol; les spores charbonneuses franchissent barrière épithéliale du tube digestif à la faveur des éraillures causées ır la déglutition des corps durs (tels que épines, échardes de bois, etc.), élés aux herbes et aux fourrages (Pasteur).

La septicémie charbonneuse est d'autant plus grave que la réacon locale, au point où s'est produite l'inoculation, est moins marquée ;

la pustule maligne de l'homme, où la lésion externe domine la symptomatologie, entraîne assez rarement la mort ; chez les animaux domestiques, où la réaction locale est à peu près nulle (quelquefois *glossanthrax*) la mort est la règle.

CHARBON EXPÉRIMENTAL.

Les animaux réceptifs à la bactéridie charbonneuse sont les suivants :

1° **Mouton.** — La marche de l'infection est très rapide, foudroyante ; souvent la mort se produit subitement après un pissement de sang ; l'animal est très sensible à l'inoculation sous-cutanée et à l'ingestion de la bactéridie. Le mouton algérien est résistant au charbon (Chauveau).

2° **Rongeurs.** — La souris, le cobaye et le lapin sont très sensibles à l'inoculation sous-cutanée et beaucoup moins à l'ingestion.

Le rat est le plus souvent réfractaire, mais cette immunité n'est pas absolue et est sujette à une grande variabilité dont on n'a pu déterminer les raisons; Feser croit l'immunité plus constante chez les animaux nourris à la viande, mais le fait mérite confirmation. Le jeune rat est plus sensible que le rat adulte.

3° **Bovidés.** — Les bovidés, très sensibles à l'ingestion, résistent mieux à l'inoculation sous-cutanée ; la mort survient très rapidement après l'inoculation par la voie digestive ; l'animal succombe après quelques heures de maladie : diarrhée sanguinolente, coliques, sueurs, convulsions.

4° **Cheval.** — Prend rarement le charbon intestinal, mais est plus sensible que le bœuf à l'inoculation sous-cutanée ; en Russie, en Corse, etc., on a pu cependant constater de nombreux cas de charbon intestinal spontané.

5° **Porc.** — Est presque complètement réfractaire au charbon.

6° **Carnassiers.** — Ils sont en général peu réceptifs ; l'ours et le chat semblent les moins résistants. Le chien ne prend pas le charbon intestinal et est très résistant à l'inoculation sous-cutanée : il se produit d'ordinaire, au lieu d'inoculation, un abcès où la phagocytose est active et l'animal échappe à la généralisation de l'infection : l'inoculation intra-veineuse est plus sévère ; le jeune chien est beaucoup plus sensible que l'animal adulte. Le renard serait absolument réfractaire (Amler).

7° **Oiseaux.** — Les oiseaux ne prennent pas le charbon intestinal et résistent d'ordinaire à l'inoculation sous-cutanée. Cependant Pasteur a réussi à rendre les poules réceptives en maintenant leurs pattes

nmergées dans de l'eau froide à 25°; Wagner est parvenu au même ésultat en abaissant la température des poules par des injections épétées d'antipyrine.

Le pigeon est un peu moins réfractaire que la poule; il succombe ssez facilement à l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil; s jeunes pigeons sont beaucoup plus réceptifs que les animaux dultes; le passage de pigeon à pigeon, répété plusieurs fois, renforce onsidérablement la virulence de la bactéridie charbonneuse; après n grand nombre de passages, on obtient un virus dont l'inoculaon sous-cutanée tue, non seulement le pigeon adulte, mais même poule (Metchnikoff).

8° **Vertébrés à sang froid.** — Les batraciens ne sont pas réceptifs; ibier a cependant pu conférer le charbon à la grenouille en mainenant l'animal inoculé dans de l'eau tiède.

Sabrazès et Colombot ont montré que l'hippocampe (poisson ophobranche) est réceptif au charbon. L'animal, placé dans les conitions normales de son existence, succombe en quelques jours à inoculation sous-cutanée de $0^{cc},25$ d'une culture en bouillon; abrazès et Colombot rattachent cette réceptivité à l'absence de la ate et à la pauvreté du sang en leucocytes chez l'hippocampe.

PRATIQUE DES INOCULATIONS.

1° **Inoculation sous-cutanée.** — Avec les précautions ordinaires, njecter sous la peau quelques gouttes de sang charbonneux ou mieux 'une culture récente en bouillon.

2° **Ingestion.** — Pasteur et Chamberland ont conféré le charbon ux moutons en les alimentant avec des fourrages mêlés d'épines, e fragments de bois et arrosés de cultures charbonneuses sporulées.

3° **Inoculation intra-veineuse.** — Injecter dans la veine une petite uantité de culture en bouillon; le sang charbonneux ne peut être mployé dans ce cas, car son injection intra-veineuse pourrait causer es embolies mortelles.

4° **Inoculation intra-musculaire.** — Se pratique chez les oiseaux lon les règles ordinaires.

SYMPTOMES DU CHARBON EXPÉRIMENTAL.

Nous décrirons ces symptômes chez le lapin et le cobaye, animaux plus fréquemment utilisés (inoculation sous-cutanée).

Huit à quinze heures après l'inoculation, apparaît autour du

point de pénétration de l'aiguille un peu d'empâtement œdémateux, puis les ganglions voisins se tuméfient légèrement; en même temps, la température centrale s'élève de un à deux degrés centigrades.

L'état général reste bon jusqu'à la vingt-quatrième ou trentième heure pour le cobaye et la trentième ou cinquantième heure pour le lapin; à ce moment, l'animal devient inquiet, sa respiration s'accélère, on observe de fréquentes urinations, puis l'animal se ramasse sur lui-même, s'assoupit, sa température s'abaisse jusqu'à 34°-30°; il tombe dans le coma et meurt en quelques minutes.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE.

1° *Au point d'inoculation*, on constate une infiltration œdémateuse plus ou moins prononcée du tissu cellulaire sous-cutané, l'exsudat est gélatineux, légèrement teinté en rouge, très pauvre en leucocytes, mais il contient de nombreuses bactéridies (œdème gélatiniforme).

2° *Les ganglions lymphatiques* voisins du point inoculé sont volumineux, ecchymotiques, entourés d'une zone d'œdème; ils contiennent de nombreuses bactéridies.

3° *Sang*. — Les bactéridies apparaissent dans le sang dès la quinzième heure; au moment de la mort, le sang est littéralement envahi. Le sang est noir, poisseux; il se coagule lentement et ne rougit pas à l'air (*sang dissous*). Il existe dans le sang une leucocytose marquée; les globules rouges sont déformés et s'agglutinent en masses irrégulières dans les préparations (*état agglutinatif*). Les veines sont turgides.

4° **Viscères**. — La bactéridie charbonneuse est exclusivement aérobie; la caractéristique anatomique du charbon est la présence des bactéries dans les capillaires sanguins; les parenchymes des organes ne contiennent pas de microbes, à moins que ceux-ci n'y aient pénétré à la suite de ruptures vasculaires. On constate toujours l'intégrité presque absolue des cellules glandulaires et épithéliales: au contraire de ce qui existe pour les autres infections, on ne rencontre jamais de lésions dégénératives.

Rate. — Turgescente, diffluente; contient un véritable feutrage de bactéridies.

Foie, poumons, glandes. — Les capillaires sanguins sont gorgés de bactéridies; les cellules épithéliales ont conservé leur intégrité. Dans la bile, on rencontre parfois de rares bactéridies mises en liberté à la faveur de ruptures vasculaires.

Chez les femelles en lactation, les bactéridies peuvent passer dans le lait par le même mécanisme (Straus et Chamberland).

Reins. — Les capillaires glomérulaires et intertubulaires sont gorgés de bactéridies ; le revêtement épithélial est sain ; il se produit souvent de petites ruptures vasculaires à la faveur desquelles les bactéries passent dans les tubuli et dans l'urine (Chamberland et Straus.)

Épiploon, intestin. — Les vaisseaux de l'épiploon et ceux des villosités intestinales sont gorgés de bactéridies.

Muscles, système nerveux. — Il existe très peu de bactéridies dans les muscles, le tissu nerveux, etc.

Placenta. — Chez les femelles pleines, la bactéridie ne franchit pas le placenta quand les vaisseaux de celui-ci conservent leur intégrité ; mais des ruptures vasculaires fréquentes permettent au virus de franchir le filtre placentaire et de pénétrer dans l'organisme fœtal (Straus et Chamberland, Perroncito, Toussaint).

RECHERCHE DE LA BACTÉRIDIE DANS L'ORGANISME.

On recherche la bactéridie charbonneuse :

1° Dans la lymphe de la pustule maligne, chez l'homme.

2° Dans le sang, les frottis et les coupes d'organes, chez l'homme et les animaux.

Le diagnostic clinique de pustule maligne, chez l'homme, devra toujours être confirmé par le diagnostic bactériologique. Chez l'homme et l'animal vivants, le passage de la bactéridie dans le sang indique la généralisation de l'infection et constitue un signe fatal : dès qu'il est constaté, la mort est proche.

Quand on recherche la bactéridie dans le cadavre, il faut savoir que, très rapidement après la mort, les cadavres charbonneux sont envahis par le *vibrion septique*, microorganisme qui peut être confondu, à un examen superficiel, avec la bactéridie charbonneuse (erreur de Jaillard et Leplat).

Prélever du sang, de la sérosité de la pustule maligne, des pulpes d'organes, de l'urine, etc.

Le sang, chez l'homme vivant, sera obtenu par piqûre du doigt; chez l'animal vivant, on le recueillera de préférence à l'oreille.

Le suc de la pustule maligne est recueilli en pratiquant (après aseptisation de la peau) une scarification à la lancette à la surface de la pustule.

Pour les autres récoltes, se reporter aux règles ordinaires.

On pratiquera des cultures, des examens microscopiques, des inoculations.

a. **Cultures**. — Ensemencer sur les divers milieux, en cultures aérobies, le sang, les pulpes, les sucs, etc.

b. **Inoculations**. — Seront pratiquées de préférence sur le cobaye avec le sang ou un peu de pulpe d'organes délayée dans l'eau ou mieux avec une culture âgée de vingt-quatre heures et préparée comme il est dit précédemment.

c. **Examen microscopique**. — Cet examen doit porter sur les préparations suivantes :

1° Lamelles de sang ;

2° Frottis d'organes et particulièrement de rate ;

3° Frottis de l'œdème gélatiniforme ou du suc de la pustule maligne.

4° *Épiploon*. — S'adresser de préférence à la souris ; prendre un fragment d'épiploon, dès que l'animal a succombé au charbon, l'étaler sur une lame avec des aiguilles, en laisser les bords se dessécher un peu, puis tirer sur ceux-ci de manière à bien tendre la membrane ; laisser dessécher à demi pour assurer l'adhérence de la membrane au verre, traiter par l'alcool-éther, puis soumettre à l'action des agents colorants.

5° *Coupes de viscères*. — Prélever des fragments de foie, de rate, d'intestin, de poumons et de reins, les fixer par l'alcool absolu, puis les monter dans la paraffine. Colorer les coupes comme ci-dessous.

COLORATION DES FROTTIS ET DES COUPES.

La bactéridie charbonneuse se colore par la méthode de Gram : cette méthode doit être employée de préférence pour la recherche et le diagnostic de la bactéridie dans les lamelles, frottis et coupes.

Les lamelles et frottis seront soumis à la double coloration (éosine et krystal violet), les coupes à la double ou mieux à la triple coloration (picrocarmin de Orth et krystal violet) ; les préparations d'épiploon seront également colorées par le violet et l'éosine. On obtient par ces procédés des préparations très démonstratives.

MORPHOLOGIE DE LA BACTÉRIDIE

ASPECT MICROSCOPIQUE.

La bactéridie se présente, au microscope, sous trois aspects différents.

Dans l'organisme des animaux et de l'homme charbonneux, la

bactéridie se rencontre exclusivement sous la *forme bacillaire*. Dans les cultures, on observe la *forme filamenteuse* et les *spores*.

I. — FORME BACILLAIRE.

Dans le sang d'un animal charbonneux, la bactéridie se présente sous la forme de bâtonnets, longs de 5 à 15 μ, larges de 1 à 1,5 μ, droits, flexibles, immobiles, homogènes; tantôt isolés, tantôt réunis en chaînettes de 2 à 3 articles atteignant une longueur totale de 20 μ environ; parfois l'intervalle qui sépare chacun des articles est si peu considérable qu'à première vue, on pourrait prendre la chaînette pour un filament homogène.



Fig. 122. — Sang charbonneux (cobaye). — Méthode de Gram (Reich. Ob. 8a; Oc. II).

Quand on les examine sans coloration, ces bâtonnets paraissent transparents comme du verre.

Ils se colorent très aisément par toutes les couleurs basiques d'aniline et ils prennent le Gram; après coloration, on observe facilement que leurs extrémités ne sont jamais arrondies, mais coupées carrément; de plus, avec les forts grossissements, on constate que ces extrémités ne sont pas nettement rectilignes, mais légèrement sinueuses, comme si le bâtonnet avait été cassé brusquement; cet aspect est, d'après Koch, caractéristique de la bactérie.

Dans l'œdème gélatiniforme les bacilles sont toujours un peu plus longs que dans le sang; d'ailleurs, la longueur de la bactéridie est variable chez les différents animaux et aussi suivant la virulence des cultures : les virus légèrement atténués donnent des formes longues (Roux, Straus, Gaffky, Koch, Löffler).

Dans l'organisme vivant, la bactéridie ne donne jamais de spores et se reproduit exclusivement par scissiparité.

Étant donnée la taille relativement grande de la bactéridie il est inutile, dans la plupart des cas, de pratiquer l'examen des préparations avec l'objectif à immersion; dans les recherches courantes, on utilisera l'objectif 8 à sec.

II. — FORME FILAMENTEUSE.

Dans les cultures, la bactéridie charbonneuse se présente d'ordinaire en longs filaments. Ces filaments seront étudiés de préférence dans une culture en bouillon.

Les filaments bactéridiens ont une largeur de 1 à 2,5 μ ; ils sont très longs, flexueux, cylindriques, onduleux et souvent enchevêtrés en paquets rappelant des écheveaux de fil, des mèches de cheveux embrouillés. Ils ne sont jamais ramifiés et présentent une immobilité absolue. Constitués par un protoplasma homogène, ils sont coupés carrément à leurs extrémités ; ils sont beaucoup plus longs dans les cultures en milieux liquides que sur les milieux solides.



Fig. 123. — Bactéridie charbonneuse (culture en bouillon). — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 8ª Oc. II).

Comme les formes bactériennes, les filaments se colorent aisément par les couleurs basiques d'aniline et prennent le Gram. On les colore de préférence à la thionine ou au krystal violet phéniqués. Les matières colorantes les montrent constitués par une gaine hyaline à l'intérieur de laquelle se trouve une série d'articles séparés par des cloisons transversales : chacun de ces articles représente une cellule, une individualité, et donne rapidement naissance à une spore.

III. — SPORES.

État frais. — Pour étudier la formation et l'évolution des spores, il est nécessaire de pratiquer un examen en gouttelette suspendue ; on adoptera de préférence la cellule de Koch sur la lamelle de laquelle on dépose une goutte d'humeur aqueuse que l'on ensemence avec une trace de sang charbonneux.

En maintenant la cellule à la température de 33-37°, on voit, peu d'heures après l'ensemencement, apparaître, dans l'intérieur du protoplasma des bactéridies, un petit point réfringent ; puis ce point

augmente de volume et devient un corps ovoïde, bien visible, grâce à sa réfringence : c'est la spore.

Bientôt le protoplasma de la cellule mère se désintègre, disparaît, et la spore n'est plus entourée que par la mince membrane d'enve-



Fig. 124. — Formation des spores chez le Bacillus anthracis. 900/1.

loppe du filament ; cette membrane disparaissant à un tour, la spore est mise en liberté.

Toutes les cellules d'un filament ne donnent pas de spores ; certaines restent stériles ; chaque cellule ne produit qu'une seule spore qui est toujours plus petite que la cellule mère.

Si le milieu est encore nutritif, on voit bientôt la spore évoluer à son tour, augmenter de volume et perdre de sa réfringence ; la membrane d'enveloppe de la spore se résorbe, le protoplasma mis en liberté s'allonge et prend la forme bacillaire (De Bary).

Coloration. — Les spores charbonneuses peuvent encore être examinées après coloration par les procédés indiqués au chapitre IX. La coloration de ces spores est assez difficile à obtenir par la méthode des doubles colorations : on aura soin, en la pratiquant, de ne pas décolorer à l'acide azotique, mais simplement à l'alcool absolu (Voy. p. 150).

Sporulation. — La sporulation ne se produit que lorsque certaines conditions de culture se trouvent réunies : la présence d'oxygène libre est indispensable ; de plus, il faut que les cultures soient maintenues à une température comprise entre +18° et 41°,5 ; à partir de 42° les spores ne se forment plus.

Résistance. — La spore représente la forme de résistance de la bactéridie ; elle possède toute la virulence de celle-ci.

Les spores résistent fort longtemps à la température de +70° et pendant cinq minutes à 85°; elles ne meurent qu'aux environs de 90-95°. Lorsqu'elles sont desséchées, et particulièrement en présence d'un liquide albumineux (sang, etc.), leur résistance se trouve encore accrue ; elles tolèrent alors des températures supérieures à 100, le contact de l'alcool absolu, de l'oxygène comprimé, la privation complète d'oxygène, l'exposition au soleil, etc.

Dans toutes ces conditions, la bactéridie non sporulée est détruite; elle est incapable de supporter même une exposition de quelques minutes à 65-70.

Arloing a montré que dans les cultures, les spores résistent moins à l'action de la lumière solaire que les bactéridies asporulées; on explique ce fait en disant que la lumière solaire agit plus énergiquement sur les bacilles jeunes issus des spores que sur la bactéridie adulte.

Recherche des spores dans une culture. — Quand on veut savoir si une culture contient des spores, on aspire un peu de cette culture dans une pipette Pasteur de petit calibre étranglée au-dessous du tampon d'ouate (Voy. fig. 68). On ferme à la lampe les deux effilures de la pipette, on place le tube scellé obtenu dans un vase plein d'eau à 70° et on l'abandonne à cette température pendant cinq à dix minutes. Après quoi, le contenu de la pipette est ensemencé dans du bouillon neuf : si la culture ne contenait pas de spores, tous les ensemencements restent stériles; on obtient, au contraire, des cultures filles si la culture primitive était sporulée. Nous trouverons plus loin l'application de cette expérience.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — La bactéridie est esssentiellement aérobie.

La température optima de culture est de 35°, mais la bactéridie se développe à toutes les températures comprises entre +14° et +43°. La formation des spores a lieu entre +18° et +42°. La bactéridie exige, pour se développer, un milieu neutre ou légèrement alcalin.

Bouillon. — Au bout de quelques heures à 35° apparaissent de légers flocons, puis ces flocons s'épaississent, deviennent cohérents et tombent au fond du vase, le bouillon reste clair.

Gélatine. — Est liquéfiée par la bactéridie.

Piqûre. — A 20-25°, apparaît, dès le second jour, le long de la

piqûre, un trait blanchâtre d'où naissent bientôt, à angle droit, de nombreux et délicats filaments d'aspect duveteux rappelant l'aspect de l'arbre de Saturne. La culture s'accentue les jours suivants, les filaments s'épaississent, puis la gélatine se liquéfie à la partie supérieure du tube ; la liquéfaction envahit peu à peu toute la gélatine et est totale vers le dixième ou douzième jour ; dans un liquide clair nagent alors de gros flocons blancs qui finissent par tomber au fond du tube.

Les arborisations manquent quelquefois ; la culture est alors réduite à la strie centrale ; l'aspect ramifié s'observe surtout quand l'ensemencement a été pratiqué avec du sang charbonneux.

Plaques. — Vers le second jour apparaissent sur les plaques d'isolement de petits points blancs grisâtres, disséminés dans la gélatine.



Fig. 125. — Très jeune culture sur gélatine de Bacillus anthracis.

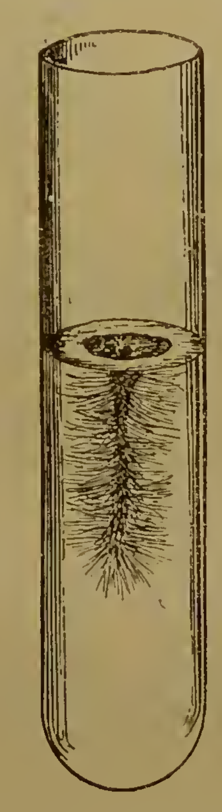


Fig. 126. — Culture de Bacillus anthracis plus âgée.

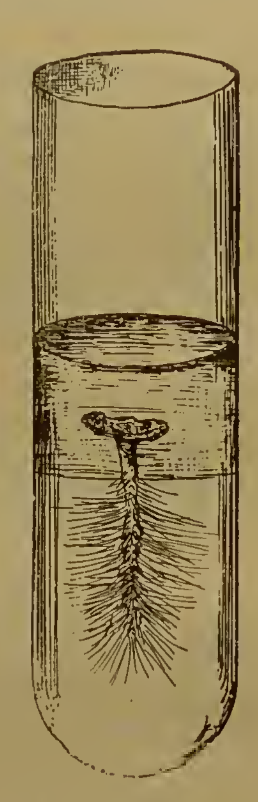


Fig. 127. — Culture âgée de Bacillus anthracis sur gélatine.

Ces points augmentent rapidement de volume et forment des taches brunâtres, granuleuses, arrondies, à bords sinueux; un faible grossissement montre que ces colonies sont constituées par des filaments enchevêtrés, ce qui leur donne l'aspect d'un peloton de fil emmêlé. Vers le quatrième ou cinquième jour, les colonies semblent

formées par des mèches ondulées rappelant l'aspect de cheveux bouclés; puis la gélatine se liquéfie autour des colonies, celles-ci se désagrègent et forment des flocons nageant dans le produit de liquéfaction.



Fig. 128. — Colonies de Bacillus anthracis sur gélatine après trois jours.

Gélose. — Dès le premier jour, dans l'étuve à 35-37^c, il apparaît sur la surface inclinée de la gélose une strie blanchâtre qui s'épaissit rapidement, devient un peu sèche, friable, et présente des bords légèrement dentelés. Cette culture est peu caractéristique.

Pomme de terre. — A 35-37^c, il se développe, dès le second jour, un enduit blanchâtre qui augmente rapidement, devient assez épais et présente une coloration blanc sale. En vieillissant, la culture prend une teinte brune.

Sérum. — *Sérum liquide*. — A 35-37^c, dès le second jour, il se produit des flocons nuageux qui tombent ensuite au fond du vase.

Sérum solidifié. — La bactéridie forme une strie d'un blanc mat qui devient grisâtre au bout de quelques jours et liquéfie en partie le sérum.

Lait. — A 35-37^c, coagulation vers le troisième ou quatrième jour; le coagulum se redissout vers le huitième jour.

Gélatine lactosée au tournesol. — Est rougie faiblement.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Résistance. — La bactéridie non sporulée est tuée rapidement quand on l'expose à des températures supérieures à $+50^c$; à $+51^c$, le sang charbonneux est stérilisé en une demi-heure. Un abaissement de température même considérable ne tue pas la bactéridie ; elle peut résister une heure à une température de $+100^c$. Les spores humides ne meurent qu'entre 90^c et 95^c ; desséchées, elles résistent à des températures beaucoup plus élevées.

La bactéridie ne tarde pas à mourir quand on la prive d'oxygène; la spore résiste fort longtemps au manque d'oxygène, à l'immersion dans l'oxygène comprimé, etc. (Voy. p. 236). La spore ne se développe pour donner naissance à une bactéridie qu'en présence d'oxygène libre.

Bactéridie asporogène. — Pasteur a vu que dans les vieilles

cultures sur gélatine, la bactéridie perd quelquefois la propriété de former des spores.

En ensemençant du bouillon avec du sang charbonneux et en l'exposant à une température de 42°,5, la bactéridie se développe, mais ne sporule pas : dans l'intérieur des bâtonnets on peut voir quelques granulations brillantes, ce sont les *fausses spores* de Chauveau qui n'ont aucune des propriétés de la spore. Les bactéridies asporulées ainsi obtenues, réensemencées dans un milieu porté à la température optima, ne tardent pas à donner de nouveau des spores.

Pour obtenir une bactéridie définitivement asporulée, il faut employer un des procédés suivants :

1° **Procédé de Roux à l'acide phénique** (*Procédé recommandé*). — Répartir dans un grand nombre (36 à 50) de tubes à essais, du bouillon de veau peptonisé, légèrement alcalin, à raison de 10 centimètres cubes par tube.

Diviser ces tubes en plusieurs séries de 10 chacune.

Dans chaque série, les tubes sont numérotés 1, 2, 3... 10 ; à chaque tube, on ajoutera une proportion d'eau phéniquée à 1 p. 100 (sans alcool), telle que :

Le tube n°	1 contienne	2/10 000	d'acide phénique,	soit	0cc,20	de la solution.
n°	2 —	4/10 000	—	—	0cc,40	—
n°	3 —	6/10 000	—	—	0cc,60	—
. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .
. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .
n°	10 —	20/10 000	—	—	2cc,00	—

Les tubes sont bouchés à l'ouate et leur extrémité est scellée à la lampe au-dessus de l'ouate, pour empêcher l'évaporation de l'acide phénique, puis ils sont stérilisés à l'autoclave.

Après refroidissement, chaque tube est ouvert et ensemencé avec une goutte de sang charbonneux ; on doit prendre soin de ne pas déposer de sang sur la paroi du tube, hors du bouillon.

Après l'ensemencement, les tubes sont placés à l'étuve à 33°-37°, après que l'on a recouvert leur extrémité avec un capuchon de caoutchouc.

Vers le dixième jour, on examine les cultures; un certain nombre de tubes n'ont fourni aucun développement : ce sont ceux où se trouvent les plus fortes doses d'acide phénique (tubes 7-10 par exemple) ; les premiers tubes de 1 à 3, par exemple, contiennent des bactéridies et des spores ; enfin les tubes 3, 4, 5, 6 pourront renfermer des bactéridies à l'exclusion absolue des spores. Mais on n'obtient pas toujours des résultats satisfaisants, aussi est-il nécessaire d'opérer simultanément sur plusieurs séries de tubes.

Pour vérifier si le contenu des tubes ne renferme plus de spores, on en aspire une petite quantité dans de très fines pipettes de Roux que l'on plonge dans un bain-marie à 65°-70° pendant quinze à vingt minutes; si la bactéridie n'est pas sporulée, elle est détruite par cette immersion et les tubes ensemencés avec le contenu des pipettes restent stériles; ces tubes cultivent au contraire si la bactéridie est sporulée.

Ce procédé de préparation du charbon asporogène ne donne pas dans tous les cas des résultats satisfaisants : tantôt aucun des tubes ne contient de bactéridie asporogène, tantôt on obtient bien des bactéridies asporogènes, mais elles reprennent la faculté de donner des spores après quelques passages en bouillon à 33°-37°.

Surmont et Arnould ont montré que la faculté de devenir asporogènes varie beaucoup pour les bactéridies de diverses provenances : une bactéridie venant de l'institut Pasteur devenait facilement asporogène entre les mains de ces expérimentateurs, tandis qu'ils échouaient quand ils s'adressaient à une bactéridie recueillie par eux dans un cas de charbon humain.

2° **Procédé de Chamberland et Roux au bichromate.** — Ce procédé, antérieur au précédent, donne des résultats inconstants; le bichromate est employé d'après les mêmes règles que l'acide phénique, mais en proportions différentes : la solution dans le bouillon à 1/2000 est celle qui convient le mieux.

3° **Procédés divers.** — Nous ne citerons que pour mémoire les procédés de Behring à l'acide rosolique et à l'acide chlorhydrique et celui de Phisalix basé sur l'emploi de la chaleur (cultures successives à 42,5°). Ces méthodes donnent des résultats très incertains.

RECHERCHE DE LA BACTÉRIDIE DANS LE SOL.

Pasteur a isolé la bactéridie de la terre des *champs maudits* en employant le procédé suivant :

On prélève une petite quantité de terre, on la broye dans un mortier, puis on la met en supension dans de l'eau stérilisée; il se produit immédiatement un précipité grossier, on décante alors avec soin le liquide surnageant qui ne contient plus que des particules très ténues, légères, et on le met à déposer dans un verre à pied stérilisé; le liquide trouble s'éclaircit et il se forme un dépôt au fond du verre; on décante alors le liquide, on aspire le dépôt dans des pipettes que l'on porte pendant quinze à vingt minutes dans un bain-marie à + 85°. Après le chauffage, on ensemence des plaques de gélatine, en boîtes de Petri, avec le contenu des pipettes. Les

plaques sont observées avec soin, on examine toutes les colonies suspectes, on les ensemence sur les divers milieux et on inocule au cobaye et à la souris les cultures obtenues.

Ce procédé est basé sur la résistance des spores à la chaleur ; les microbes pyogènes sont détruits par le chauffage à 85°, et les cultures sur plaques éliminent les espèces anaérobies, telles que le vibrion septique, dont la présence fausserait les résultats de la recherche. Dans le procédé primitivement employé par Pasteur, le dépôt obtenu par lévigation était inoculé aussitôt après le chauffage, sans isolement des colonies, mais ce procédé est moins rigoureux.

En employant une méthode analogue à celle que nous venons de décrire, Diatroptoff a isolé la bactéridie dans la vase du fond d'un puits.

VIRULENCE. — ATTÉNUATION. — VACCINATION.

Le charbon ne récidive pas chez l'homme; en règle, il est mortel chez les animaux domestiques; cependant des vaches ayant résisté au charbon après une maladie très grave supportèrent par la suite, sans aucun accident, l'inoculation d'une bactéridie très virulente (Pasteur); d'autre part, on avait constaté, dans la Beauce, que certains moutons restaient réfractaires au charbon et on supposait, pour expliquer cette immunité, que ces animaux avaient eu antérieurement une atteinte de charbon avorté. Pasteur songea à conférer aux animaux une maladie bénigne pour les préserver du charbon spontané.

Pour arriver à ce résultat, la première condition à remplir est d'obtenir un virus atténué, or, la spore conservant et perpétuant la virulence de la bactéridie qui lui a donné naissance, il faut d'abord empêcher la bactéridie de former des spores. On opère ainsi qu'il suit :

1° On ensemence du sang charbonneux dans un ballon de bouillon que l'on place à l'étuve à 42°,5 : la bactéridie se développe, mais ne donne pas de spores.

La culture est très virulente les premiers jours, mais cette virulence faiblit bientôt, si bien que vers le huitième ou dixième jour, la bactéridie est devenue inoffensive pour le cobaye et le lapin. Cette atténuation est due à l'action combinée de l'air et de la chaleur sur le microbe.

Prend-on une culture ainsi atténuée et l'inocule-t-on à un mouton, cet animal ne présente qu'une maladie très légère et quand il est rétabli, il résiste à l'inoculation d'une culture pleinement virulente. *L'inoculation du virus atténué confère l'immunité.*

2° En ensemençant dans un ballon maintenu à 33°-37° la bacté-

ridie atténuée elle forme de nouveau des spores et ces spores fixent la virulence de la bactéridie atténuée : on peut ainsi conserver indéfiniment une *race* dont le degré de virulence est déterminé et invariable.

3° A la bactéridie atténuée, devenue saprophytique, on peut rendre sa virulence par une série de passages par les animaux appropriés.

Soit une bactérie ne tuant plus la souris adulte, on l'inocule à une souris venant de naître : celle-ci meurt en deux ou trois jours. Avec le sang de ce premier animal, on inocule une seconde souris âgée de trois jours qui succombe à son tour et dont le sang sert à inoculer une souris de six jours. Celle-ci fournira un sang charbonneux capable de tuer une souris adulte : le sang de cette souris servira à inoculer un jeune cobaye; on continuera la série par un cobaye adulte, un lapin, puis on passera au mouton, au bœuf et on arrivera à posséder de nouveau une bactéridie excessivement virulente.

Pratique des vaccinations. — L'animal est d'autant mieux vacciné que l'atteinte vaccinale est plus forte. D'autre part, il y a un danger à inoculer de prime abord un vaccin énergique : on risque de tuer l'animal qu'on désire préserver.

On concilie ces deux considérations en utilisant deux vaccins : on inocule d'abord un vaccin à peu près inoffensif, tuant la souris, mais n'ayant aucune action nocive sur le lapin et le mouton (*premier vaccin*). Puis, au bout d'une douzaine de jours, on inocule le second vaccin qui a subi une atténuation moins prolongée et qui est capable de tuer la souris, le cobaye et quelquefois le lapin (2 fois sur 6 ou 8); douze jours après cette seconde inoculation, l'immunité est acquise (*deuxième vaccin*).

Le vaccin préparé par l'institut Pasteur est livré aux vétérinaires par tubes de 100 doses (au prix d'un sou la dose) ; on inocule successivement le premier et le deuxième vaccin, à la vache à la dose de 1/4 centimètre cube et au mouton à la dose de 1/8 centimètre cube.

Les inoculations se font, de préférence : pour le premier vaccin, à la face interne de la cuisse droite; pour le deuxième, à la face interne de la cuisse gauche; on met un intervalle de douze jours entre les deux inoculations. Il est nécessaire d'employer le vaccin dès qu'il a été fourni. Les inoculations doivent être pratiquées avec une seringue stérilisée; il est important de ne pas utiliser un produit souillé qui, du fait même de la souillure, perd toutes ses propriétés. Dans toutes les contrées où l'on emploie le vaccin charbonneux le charbon est en voie de disparition.

Immunisation des petits animaux. — Dans les recherches de laboratoire, on peut avoir besoin d'immuniser contre le charbon de petits animaux tels que le lapin et le cobaye. Cette immunisation est diffi-

cile à obtenir; la sensibilité de l'animal est telle que la mort survient souvent au cours des vaccinations. Il est bon d'avoir, dans ce cas, plusieurs vaccins de virulence croissante; on en utilise trois d'ordinaire; le premier vaccin doit être très atténué, puis on passe au *premier vaccin pour moutons*, puis au second; les inoculations doivent être faites très prudemment. Marchoux a obtenu l'immunisa-ion au moyen des seuls vaccins pour moutons: il cultive ces vaccins à l'étuve à 37° dans du bouillon de veau peptonisé et utilise les cultures âgées de vingt-quatre heures. On commence par inoculer au lapin, sous la peau, 1/2 centimètre cube de premier vaccin (dose maxima non mortelle). Il se produit un peu de fièvre, de la diarrhée et une diminution de poids. Au bout de douze jours, on donne une dose double du même virus; après une nouvelle période de douze jours, on injecte 1/4 de centimètre cube d'une culture de vingt-quatre heures du deuxième vaccin, puis après douze jours encore une dose double (1/2 centimètre cube) du même vaccin. Huit jours après cette inoculation, on peut éprouver l'animal avec quelques gouttes de sang charbonneux injectées sous la peau; puis, si la réaction n'est pas trop forte, on complète l'immunisation par des inoculations fréquentes de sang charbonneux ou de cultures en bouillon âgées de vingt-quatre heures. Par ce procédé, Marchoux est arrivé à obtenir des lapins supportant des doses journalières de 1 centimètre cube de charbon virulent; d'autres lapins purent recevoir tous les cinq jours des doses progressives atteignant finalement 20 centimètres cubes.

PRODUITS SOLUBLES.

TOXINE CHARBONNEUSE.

Dans les milieux artificiels, la bactéridie transforme les albuminoïdes en ammoniaque (Perdrix) en même temps qu'il se produit, suivant Ivanoff, des acides volatils tels que l'acide formique (domine dans les cultures jeunes), l'acide acétique (domine dans les cultures anciennes), l'acide caproïque, et peut-être l'acide valérianique. Enfin, la bactéridie sécrète une toxine dont on n'a pu, jusqu'à présent, déterminer la nature exacte.

I. — Hankin prépare un bouillon d'extrait de Liebig à 1 p. 100, légèrement alcalinisé et stérilisé à l'autoclave, auquel il ajoute 30 à 50 p. 100 de fibrine fraîche, stérilisée elle-même pendant quinze minutes à 115°. Le milieu ainsi obtenu est ensemencé avec du sang virulent et maintenu pendant huit jours à 20°. On le filtre

alors sur une bougie Chamberland et on précipite le filtrat par le sulfate d'ammoniaque; le précipité est recueilli sur un filtre et soumis à la dialyse dans un courant d'eau, de préférence chauffée à 42°-45°, jusqu'à ce que le sulfate d'ammoniaque ait complètement disparu. On verse alors le liquide contenu dans le dialyseur dans 10 fois son volume d'alcool fort pour précipiter l'albumose; on lave à l'alcool absolu le précipité, on le dissout dans une petite quantité d'eau et on filtre sur amiante.

L'albumose ainsi obtenue injectée à des souris à très petites doses (1,5/1 000 000 du poids de l'animal) leur conférerait une certaine résistance contre la bactéridie. Chez les animaux sensibles au charbon, même à des doses de 500 à 700 fois plus fortes que la dose vaccinale, cette albumose ne produit aucun symptôme d'empoisonnement; au contraire, chez les animaux naturellement réfractaires elle agirait comme une toxine énergique (Hankin et Wesbrook). Les conclusions de ce travail ont été critiquées par Petermann et par Marmier.

II. — Au moyen d'une technique très complexe Brieger et Fränkel isolent des cadavres charbonneux une toxalbumine capable de produire des symptômes d'intoxication chez différents animaux. De même, Sidney Martin, dans des solutions d'alcali-albumine, obtient une albumose qui, à la dose de 3 centigrammes, tue une souris de 22 grammes avec des symptômes analogues à ceux de la septicémie charbonneuse.

III. — Marmier obtient une toxine active en cultivant la bactéridie à basse température dans une solution de peptone pure glycérinée.

Milieu de Marmier. — Commencer par purifier la peptone du commerce. Pour cela, dissoudre dans l'eau une certaine quantité de cette peptone et ajouter à la dissolution assez de sulfate d'ammoniaque pour que la liqueur en soit saturée à + 100°. Faire bouillir quelques minutes, puis filtrer. A la liqueur filtrée, ajouter une quantité d'hydrate de baryte suffisante pour précipiter tout l'acide sulfurique qu'elle contient en dissolution. Maintenir le mélange plusieurs heures à une température voisine de l'ébullition pour chasser l'ammoniaque; filtrer pour se débarrasser du sulfate de baryte, porter le filtrat à l'ébullition en y faisant passer d'abord un courant d'air pour éliminer toute trace d'ammoniaque; puis un courant d'acide carbonique pour précipiter l'excès de baryte; filtrer. Avec la solution de peptone pure ainsi obtenue, on préparera le milieu suivant :

Eau	1000 centimètres cubes.
Peptone	40 grammes.
Sel marin	15 —
Phosphate de soude	0gr,50
Phosphate de potasse	0gr,20
Glycérine pure	40 grammes.

Filtrer, répartir dans des ballons Pasteur de 250 centimètres cubes et stériliser à 115°.

On ensemence le milieu avec du charbon virulent, on porte à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures, puis à 20° pendant quinze jours.

On filtre alors la culture et on la sature de sulfate d'ammoniaque, à la température ordinaire; au bout de quinze heures environ le liquide est filtré sur papier et on lave le filtre avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque. Le précipité resté sur le filtre est traité par une quantité aussi petite que possible de glycérine; au bout de deux jours, on décante, on remplace la glycérine par de la glycérine neutre et on décante de nouveau. Les liqueurs glycérinées sont réunies et mélangées à quatre fois leur poids d'alcool fort; le précipité versé sur un filtre est lavé à l'alcool absolu, à l'éther, puis desséché dans le vide. On obtient une substance amorphe, pulvérulente, de couleur brun foncé, renfermant de petites quantités de sulfate d'ammoniaque, soluble dans l'eau distillée et dans l'eau phéniquée à 1 p. 100 et ne présentant aucune des propriétés des matières albuminoïdes, des peptones, des para-peptones, ni des alcaloïdes.

Cette substance est douée de propriétés toxiques assez énergiques vis-à-vis du lapin; l'inoculation de doses relativement faibles est susceptible de causer la mort de l'animal; la dose toxique varie pour chaque individu dans des proportions assez élastiques; c'est ainsi que certains lapins succombent à l'inoculation de 25 milligrammes (en solution aqueuse); d'autres exigent des doses de 120 et même 200 milligrammes.

Quelques heures après l'injection, on note une élévation notable de la température centrale; pendant quelques jours, la température oscille largement, puis, si l'animal doit succomber, elle s'abaisse progressivement (jusqu'à 8° au-dessous de la normale); si l'animal se rétablit, au contraire, les oscillations de la température vont en s'atténuant peu à peu.

En même temps que se produisent ces modifications de la température, l'animal maigrit, se cachectise et peut perdre jusqu'à 1/3 de son poids; on observe ordinairement de la diarrhée.

Avant la mort, apparaît de la paraplégie, la respiration devient pénible, l'animal se couche sur le flanc et présente des convulsions et des contractures. La mort survient plus ou moins longtemps après l'injection (du deuxième au quinzième et vingtième jour) suivant la dose de toxine inoculée.

Les cobayes, les souris, sont sensibles à la toxine. Contrairement à ce qu'avait vu Hankin, les animaux réfractaires au charbon paraissent presque indifférents à la toxine; il en est de même des lapins immunisés contre le charbon par les cultures atténuées.

La toxine est atténuée, mais non complètement détruite par le chauffage à 110° ; elle devient inactive quand on la met au contact des hypochlorites alcalins ou quand on l'expose à une insolation prolongée en présence de l'air.

Les cultures charbonneuses dans d'autres milieux liquides tels que le sérum de sang de bœuf, les bouillons de bœuf, de veau, de cheval contiennent peu de toxines. Marmier a pu extraire une toxine active des cultures récentes sur gélose : on racle des cultures de deux jours, les microbes sont mis à macérer dans de l'alcool à 20° additionné de quelques gouttes d'éther. Après vingt-quatre heures, on filtre et on précipite le filtrat par l'alcool absolu ; le précipité obtenu est lavé sur un filtre avec de l'alcool absolu puis de l'éther ; enfin, on le dessèche dans le vide en présence de l'acide sulfurique. La substance pulvérulente obtenue a la même activité que celle que l'on retire des cultures en eau peptonisée glycérinée. Ce résultat indique que primitivement les toxines sont contenues dans le corps des microbes.

VACCINATION PAR LES PRODUITS SOLUBLES.

I. — Toussaint, chauffant du sang charbonneux défibriné à 55° pendant dix minutes, puis l'inoculant au mouton, conférait l'immunité à cet animal.

On se place dans des conditions plus rigoureuses en chauffant du sang charbonneux à 60°, à trois ou quatre reprises différentes, puis en l'injectant au mouton ; on obtient ainsi une immunité peu solide, qui disparaît après un temps variant de un mois à trois ans.

II. — Hankin avait annoncé qu'au moyen de sa toxine préparée en bouillon Liebig-fibrine, on confère aisément aux animaux l'immunité contre le charbon ; après les objections de Petermann, il reprit ses recherches et obtint des résultats moins satisfaisants : l'injection de doses égales à 1,5/1 000 000 du poids du corps a une action immunisante sur les souris, mais cette action est passagère et un petit nombre seulement des animaux immunisés résistent à l'inoculation d'épreuve.

III. — Marmier, à l'aide de la toxine préparée en solution de peptone glycérinée, est arrivé à conférer l'immunité aux animaux de laboratoire. Les lapins, après avoir reçu de petites doses répétées, acquièrent une certaine accoutumance qui ne persiste pas au delà de cinq à six semaines après l'inoculation de la dernière dose. On arrive d'une façon certaine à accoutumer les lapins à des doses de toxine qui auraient été mortelles si elles avaient été données de prime abord.

Pour obtenir l'immunisation, on donne le premier jour une dose très faible, par exemple 3 milligrammes de toxine à un lapin; dès que l'animal est rétabli, c'est-à-dire après six jours environ, on lui injecte une quantité plus considérable de toxine, 6 milligrammes par exemple; quand la réaction est terminée, on injecte une troisième dose de 15 milligrammes. Dans la majorité des cas, une douzaine de jours après cette troisième injection, on peut inoculer à l'animal, sans qu'il succombe, du charbon virulent. On peut porter progressivement à 20 et 30 milligrammes les doses injectées; on obtient alors, à peu près à coup sûr, l'immunisation ; il faut avoir soin d'attendre le rétablissement complet de l'animal avant de faire l'inoculation d'épreuve.

SÉROTHÉRAPIE.

I. — Behring a montré que le sérum des rats blancs jouit de propriétés bactéricides vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse. Quand on injecte à des souris un peu de culture de charbon additionnée de sérum de rat, les souris ne présentent aucun accident.

Roux et Metchnikoff ont établi que cette action ne s'exerce qu'à la condition qu'il y ait mélange de la bactéridie et du sérum. Quand on inocule séparément la culture et le sérum, les souris succombent fatalement à l'inoculation ; de plus, cette action bactéricide n'a aucun rapport avec la prétendue immunité du rat blanc vis-à-vis de la bactéridie : Roux et Metchnikoff ont montré qu'un grand nombre de rats blancs étaient réceptifs au charbon alors que leur sérum jouissait de la propriété bactéricide.

II. — Marchoux a établi que le sérum des lapins et des moutons immunisés contre le charbon par la méthode des virus atténués possédait des propriétés préventives et thérapeutiques.

Les lapins doivent être immunisés, comme nous l'avons dit p. 242; les moutons, après la vaccination pastorienne, reçoivent sous la peau des doses de cultures virulentes de plus en plus fortes, doublées de huit jours en huit jours, et finissant par atteindre 200 et 300 centimètres cubes injectés en une seule fois. Il est nécessaire que l'animal supporte ces doses énormes pour que son sérum possède des propriétés préventives et curatives. On laisse ensuite reposer le mouton pendant quinze ou vingt jours et on peut opérer la saignée ; l'expérience montre que c'est à ce moment que le sérum est le plus actif. Une fois recueilli, le sérum conserve longtemps toute son activité.

Marchoux a obtenu un sérum de mouton actif au 1/2000, dont 1 centimètre cube, injecté vingt-quatre heures avant 1/4 centimètre

cube de culture virulente, protégeait un lapin de 2 kilogrammes ; les inoculations étaient faites sous la peau du flanc, le sérum d'un côté, la culture de l'autre. L'inoculation de la culture sous la peau de l'oreille est plus sévère : pour protéger l'animal, il faut deux fois plus de sérum que dans le cas précédent ; l'inoculation intrapéritonéale de la culture exige des doses encore plus considérables de sérum : au moins 15 centimètres cubes de sérum au 2/1000e pour protéger un lapin de 2 kilogrammes ; dans le cas où l'inoculation de la culture a été pratiquée dans les veines, 20 centimètres cubes de sérum actif à 1/2000e n'ont pu donner au lapin que trois jours de survie sur le témoin.

L'injection préventive de sérum n'est pas plus active quand elle est pratiquée dans le péritoine que quand on la fait sous la peau ; par contre, l'injection intra-veineuse est moins active : 10 centimètres cubes d'un sérum actif au 2/1000e n'ont pas préservé des lapins de 2 kilogrammes contre l'inoculation sous-cutanée de 1/4 de centimètre cube de culture virulente.

Le sérum actif au 2/1000e s'est montré inactif chez le cobaye ; Marchoux n'a obtenu qu'une survie plus ou moins longue même avec des doses très fortes de ce sérum.

Inoculé en même temps que la culture virulente, le sérum de lapin vacciné a assuré la guérison de l'animal (lapin) 7 fois sur 24 expériences ; dans les 17 autres cas, les animaux ont toujours eu une survie sur les témoins. Les doses de sérum injectées variaient de 7 à 17 centimètres cubes. Les lapins qui ont survécu n'ont présenté aucun symptôme de maladie ; tous les individus qui ont eu de l'œdème ont succombé.

Un lapin traité quatre heures après l'inoculation par 6 centimètres cubes de sérum a survécu ; un autre traité sept heures après l'inoculation est mort cent huit heures après le témoin.

Avec un sérum de mouton actif au 1/800e, Marchoux est arrivé à guérir un lapin inoculé depuis sept heures (7 centimètres cubes de sérum) ; avec le sérum actif à 1/2000e, l'injection de 10 centimètres cubes faite vingt-quatre heures après l'inoculation a été curatrice.

Quand l'œdème est bien marqué au moment de l'intervention la guérison ne se produit pas, même avec des doses énormes de sérum (15 à 20 centimètres cubes de sérum actif au 1/2000e).

Quand on injecte le sérum avant ou immédiatement après la culture virulente, le lapin ne présente aucun signe de maladie, mais il n'acquiert pas l'immunité : inoculé plus tard, il succombe au charbon en même temps que les témoins. Au contraire, quand l'intervention a été tardive, quand le sérum a été donné de sept à vingt-quatre heures après l'infection, il se produit un commencement de ma-

ıdie qui suffit pour conférer à l'animal une résistance solide au harbon. Après l'injection du sérum on observe une excitation assagère de la réaction phagocytaire, phénomène qui aboutit à la estruction des bactéridies.

La sérothérapie du charbon n'a point encore trouvé d'application la pathologie humaine.

CHAPITRE II

LE VIBRION SEPTIQUE

Le vibrion septique est le germe pathogène anaérobie le plus anciennement connu et étudié. En 1887, Pasteur fixait la morphologie et la biologie du vibrion septique, en même temps qu'il décrivait sous le nom de *septicémie expérimentale aiguë*, la maladie qui succède à son introduction dans le tissu cellulaire sous-cutané des animaux de laboratoire ; puis Chauveau et Arloing ont montré que le vibrion de Pasteur est l'agent de la gangrène gazeuse foudroyante de l'homme (septicémie gangreneuse, érysipèle bronzé) ; Krannhals lui attribue la maladie des chiffonniers.

La gangrène traumatique des animaux domestiques est également causée par le vibrion septique.

Le vibrion septique est très répandu dans les milieux extérieurs ; il existe à l'état de spores dans la terre de jardin, de rue, etc., dans la vase de différentes eaux, etc.

Le vibrion septique se rencontre dans l'intestin ; on l'a isolé des matières fécales de l'homme et des animaux : après la mort, il passe de l'intestin dans le sang ; cette invasion du sang est particulièrement rapide chez les animaux ayant succombé au charbon.

Dans les ouvrages allemands, le vibrion septique est désigné sous le nom de bacille de l'œdème malin.

SEPTICÉMIE EXPÉRIMENTALE.

La plupart des animaux sont réceptifs au vibrion septique.

Le cobaye et la souris sont d'une sensibilité extrême ; un millionième de goutte de sérosité septique suffit pour tuer un cobaye (Davaine) ; le lapin et le rat blanc viennent immédiatement après dans l'échelle de réceptivité : le mouton, la chèvre, le cheval, l'âne sont encore très sensibles ; le chat, que l'on place à tort parmi les animaux peu réceptifs, est sensible au même degré que ces animaux ; le chien est un peu moins sensible, puis viennent les petits oiseaux, les poules, le pigeon

Le rat d'égout est à peu près réfractaire; il ne meurt que sous l'influence de doses élevées d'un virus très actif, après avoir présenté une grosse lésion locale purulente.

Besson a montré que les passages en série par le cobaye exaltent la virulence du vibrion; on obtient rapidement un virus exalté tuant le cobaye et le lapin en huit heures à des doses inférieures à 1/100 de centimètre cube et dont 1 goutte de culture en bouillon tue le chat en douze à quinze heures.

Le vibrion septique est un anaérobie strict; il ne se développe dans l'organisme qu'à la condition d'être inoculé profondément sous la peau, dans les muscles ou dans la cavité péritonéale; il n'infecte pas les plaies superficielles.

On peut conférer la septicémie aux animaux par plusieurs procédés :

I. *Inoculation d'une culture ou de sérosité d'œdème.* — L'inoculation sous-cutanée est très sévère; elle tue rapidement les animaux réceptifs, même avec des doses inférieures à 1/100e de centimètre cube.

II. *Inoculation de spores pures. — Associations microbiennes.* — Besson a montré que les spores pures de vibrion septique injectées même à doses considérables (jusqu'à 4 à 5 millions de spores pour le cobaye et 1 400 000 pour le lapin) dans le tissu cellulaire sous-cutané des lapins et des cobayes ne se développent pas; elles sont rapidement englobées par les phagocytes et l'animal ne présente aucun autre symptôme qu'un petit nodule dur siégeant au lieu d'inoculation et disparaissant au bout de quelques jours.

On obtient aisément des spores pures en débarrassant les cultures de la toxine par le chauffage : une culture sporulée en bouillon est aspirée dans un petit tube de verre que l'on ferme ensuite aux deux extrémités; le tube est chauffé au bain-marie pendant trois heures à 80°; l'inoculation de grandes quantités de cette culture chauffée est inoffensive, mais les ensemencements en bouillon donnent toujours lieu à une culture très virulente. Un procédé plus simple encore consiste à utiliser des cultures qui ont séjourné plusieurs mois à l'étuve à 37°; la toxine disparaît dans ces cultures et on se trouve en présence de spores pures.

Mais il suffit d'ajouter à quelques spores pures une petite quantité d'une substance chimiotaxique négative pour que les phagocytes ne puissent plus accomplir leur rôle protecteur et pour que la septicémie se manifeste; c'est ainsi que l'inoculation d'une trace de spores pures additionnées d'une gouttelette d'acide lactique entraîne fatalement la mort de l'animal; on arrive au même résultat en ajoutant aux spores une petite quantité de toxine septique, qui est douée de propriétés chimiotaxiques négatives, ou en les protégeant

mécaniquement contre les phagocytes en les plaçant dans un petit sac de papier filtre stérile, ou à l'intérieur d'un petit cube de gélose, qu'on introduit sous la peau d'un cobaye.

On arrive encore plus aisément à produire la septicémie par inoculation de spores débarrassées de toxine si on mélange à celles-ci une quantité inoffensive par elle-même de certains microbes dont les produits de sécrétion ont des propriétés chimiotaxiques négatives; ces microbes favorisants sont très nombreux, on en trouve un grand nombre dans la terre; le micrococcus prodigiosus, le staphylocoque doré jouissent de cette propriété.

De même, les traumatismes produisant la mortification des tissus (brûlures, compressions vasculaires, etc.), entraînent le ralentissement de la phagocytose et favorisent le développement des spores.

III. *Inoculation de terre contenant des spores.* — Quand on inocule sous la peau d'un cobaye ou d'un lapin une trace de terre de rue ou de jardin, l'animal succombe fréquemment à la septicémie de Pasteur. Ici le développement des spores contenues dans la terre est facilité par leur association aux microbes favorisants très répandus dans le sol.

Symptômes et lésions. — L'évolution de la septicémie expérimentale aiguë revêt le même aspect chez les différents animaux; elle est simplement plus ou moins rapide suivant les espèces. Nous décrirons comme type la maladie du cobaye.

Après l'inoculation sous la peau de la cuisse ou de l'abdomen d'une trace de culture virulente, il se produit très rapidement de l'œdème au point d'inoculation ; quelques heures après l'inoculation, l'animal se blottit dans un coin de la cage, il reste immobile, son poil se hérisse, il pousse des cris dès qu'on le saisit; bientôt apparaissent des secousses convulsives et la mort termine la scène souvent en moins de douze heures.

Quand le virus est très exalté, l'animal ne présente qu'un œdème insignifiant au point d'inoculation, la marche de la septicémie se précipite, la mort arrive presque subitement après très peu d'heures de maladie.

A l'*autopsie*, on constate la plus ou moins grande extension de l'œdème au point d'inoculation ; aux alentours, les muscles sont rouges, jambonnés, infiltrés de sérosité, le tissu conjonctif est insufflé par des bulles d'un gaz fétide et crépite sous le doigt.

Le cadavre entier dégage une odeur puante ; la cavité péritonéale contient une sérosité plus ou moins abondante, à peine louche ; le foie est décoloré, la rate est diffluente, les poumons ont l'aspect normal.

La sérosité de l'œdème contient le vibrion en abondance, mais ne

renferme pas de leucocytes ; la sérosité péritonéale examinée sur lamelles donne aussi l'apparence d'une culture pure de vibrions ; jamais ces vibrions ne sont sporulés pendant la vie de l'animal, mais les spores y apparaissent rapidement après la mort, surtout si on place le cadavre dans l'étuve à 35°.

Pendant la vie, on ne trouve pas ou très rarement le vibrion dans le sang de l'animal; mais il y passe assez rapidement après la mort ; on obtient des lamelles de sang riches en microbes en laissant le cadavre quelques heures à 35°.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le vibrion septique se présente sous la forme de bâtonnets longs de 3 à 15 μ, larges de 0,6 à 1 μ, plus fins que la bactéridie charbonneuse, isolés ou réunis en chaînettes ; ces chaînettes sont surtout fréquentes dans le sang prélevé sur des cadavres conservés quelques heures à 37°; elles constituent alors des filaments pouvant atteindre jusqu'à 40 μ de longueur et composés de segments inégaux entre eux. Les bâtonnets sont quelquefois droits, plus souvent flexueux, ondulés. Les extrémités des bâtonnets sont coupées nettes, à peine arrondies aux angles; leur aspect diffère entièrement de celui des bactéridies charbonneuses (ligne sinueuse à angles accusés).



Fig. 129. — Vibrion septique (frottis avec la surface du foie d'un cobaye). — Thionine phéniquée (Reich. Ob. 1/12 imm. ; Oc. II).

Le vibrion septique est mobile, mais sa mobilité ne se manifeste qu'en l'absence de l'air; aussi la recherchera-t-on au centre et non sur les bords de la préparation ; les bâtonnets se déplacent par un mouvement de reptation lent et ondulant. Ces mouvements sont dus à des cils vibratiles situés de chaque côté du bâtonnet.

Dans le cadavre des animaux et dans les cultures se forment rapidement des spores ; la spore apparaît comme un point ovoïde

brillant, réfringent, produisant un renflement, soit à la partie médiane, soit à une des extrémités des bâtonnets ; les formes en *clostridium* sont les plus fréquentes.

Coloration. — Le vibrion septique se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline. Il se colore par la méthode de Gram ; l'affirmation que le vibrion septique ne prend pas le Gram, répétée dans certains manuels, est une erreur. Il est vrai de dire que la coloration du vibrion par la méthode de Gram est inconstante si l'on ne prend pas certaines précautions : le colorant de choix est le violet de gentiane phéniqué, il doit rester cinq à dix minutes au moins en contact avec la préparation avant l'action de la solution iodée. D'ailleurs, on colore très aisément le vibrion par la méthode de Claudius qui se comporte exactement comme la méthode de Gram vis-à-vis de toutes les autres bactéries ; ce fait tranche définitivement la question.

Les spores se colorent par les procédés ordinaires (Voy. p. 149).

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le vibrion de Pasteur est un anaérobie strict; on ne pourra le cultiver qu'en utilisant les méthodes décrites au chapitre VI.

C'est aux cultures obtenues par ces méthodes que s'appliquent les descriptions que nous donnons ci-dessous; ces descriptions sont dues à Roux. Le vibrion septique cultive lentement à partir de + 15^c ; la température optima est de + 37^c environ; nous avons encore obtenu des cultures abondantes à + 41^c.

Bouillon. — A 37^c, apparition d'un trouble marqué vers la douzième ou vingtième heure ; il se produit des gaz en abondance; ces gaz sont constitués en grande partie par de l'acide carbonique et de l'hydrogène, mélangés à des hydrocarbures et à des gaz sulfurés; une odeur infecte se dégage; la réaction du milieu ne change pas. Bientôt le bouillon s'éclaircit et il se forme un dépôt au fond du tube.

Tant que le bouillon est trouble, il renferme de nombreux bacilles qui sporulent à partir de la vingt ou vingt-quatrième heure. Dans le dépôt, on ne trouve plus que des spores et des bacilles granuleux et désagrégés.

Milieux albumineux. — La culture se produit comme dans le bouillon, mais elle est beaucoup plus abondante ; le sang, le bouillon mêlés à de la sérosité péritonéale, le sérum pur ou étendu de son volume d'eau et le jus de viande stérilisé par filtration sur la bougie Chamberland donnent de très riches cultures.

Après beaucoup de tâtonnements, nous utilisons actuellement le procédé suivant qui donne des cultures excessivement abondantes : 500 grammes de viande maigre de bœuf, finement hachée, on ajoute 500 centimètres cubes d'eau distillée et une forte pincée de sel marin. On abandonne le tout au repos à la glacière pendant douze à vingt heures; au bout de ce temps, on décante le liquide et on exprime le résidu à la presse à viande; le jus de viande ainsi obtenu est additionné de solution normale de soude jusqu'à réaction alcaline faible, puis chauffé à 115° pendant cinq minutes. Au sortir de l'autoclave filtrer sur papier Chardin ; le liquide brun foncé obtenu est stérilisé à 112° pendant vingt minutes; il se forme un léger coagulum pendant la stérilisation, ce coagulum se dissout pendant la culture.



. 130. — Culture de vibrion septique dans la gélatine (D'après Fränkel et Pfeiffer).

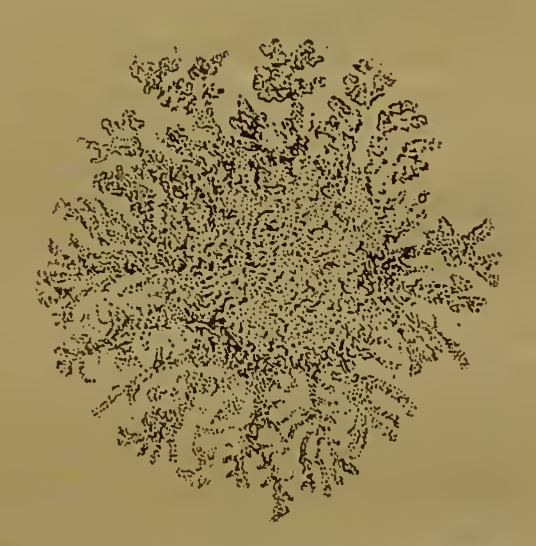


Fig. 131. — *Bacillus septicus.* — Colonie isolée dans la gélose (D'après Liborius).

Gélatine. — *Piqûre profonde.* — A 27°, le développement commence au bout de deux ou trois jours; le long de la piqûre apparaissent de petites sphères moyennes qui confluent rapidement, formant une longue traînée blanchâtre ; dès ce moment, apparaissent des bulles de gaz qui fissurent la gélatine et la culture se propage irrégulièrement dans ces fissures, la liquéfaction survient très rapidement et s'étend à toute la gélatine.

Colonies isolées. — Dès le deuxième ou troisième jour, apparition à l'intérieur de la gélatine de petites taches nuageuses blanchâtres, à contours mal définis qui liquéfient le milieu autour d'elles ; il se forme des bulles de gaz.

Gélose. — *Piqûre profonde.* — A 37°, très rapidement il se développe une traînée blanchâtre nuageuse le long de la piqûre ; des bulles de gaz fragmentent la gélose et la culture envahit les fissures.

Pomme de terre. — Sur la pomme de terre, il ne se produit pas de culture apparente.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Les vibrions non sporulés périssent facilement au contact de l'air ou par une exposition de quelques instants à une température de + 60°.

Les spores ne se forment qu'à l'abri de l'air, mais une fois formées, elles résistent très bien à l'action de l'oxygène. Les solutions usuelles des antiseptiques sont à peu près sans action sur elles (Chauveau et Arloing). A l'état humide, elles supportent pendant plusieurs heures une température de 80° et résistent plus d'une demi-heure à 90° (Besson) ; desséchées dans les matières albuminoïdes, elles ne sont tuées par la chaleur humide qu'à des températures supérieures à 100°. D'après San Felice, elles ne sont pas atteintes par une exposition de cinquante heures à la lumière solaire ni par une dessiccation prolongée pendant plusieurs mois.

Virulence. — La spore fixe la virulence du vibrion ; cette virulence se maintient indéfiniment dans les cultures, mais pour la pratique des inoculations, il faut toujours rajeunir la culture, étant donné qu'aux doses ordinaires, les spores seules sont inactives et que la toxine s'altère par le vieillissement.

Faute de prendre cette précaution, on s'exposerait à conclure à une atténuation du germe, atténuation qui ne se produit pas en réalité.

Nous avons dit qu'il est aisé d'exalter la virulence du vibrion par les passages en série chez le cobaye.

TOXINE.

Dès 1887, MM. Roux et Chamberland ont étudié le poison que le vibrion septique produit dans les cultures et dans l'organisme vivant. Après l'inoculation, le vibrion se multiplie et envahit rapidement la totalité de l'organisme : il ne faut donc pas

s'attendre à ce que sa toxine ait la même activité que celle des microbes qui, comme les bacilles du tétanos et de la diphtérie, se cultivent uniquement au point d'inoculation. Alors que les toxines de ces derniers microbes amènent la mort des petits animaux de laboratoire à des doses presque infinitésimales, le filtrat des cultures du vibrion septique ne produit une maladie mortelle, chez les mêmes animaux, qu'autant qu'on en injecte plusieurs centimètres cubes.

En filtrant sur la bougie Chamberland la sérosité qui infiltre les muscles des cobayes et des lapins ayant succombé à la septicémie, Roux et Chamberland obtiennent un produit qui, injecté dans le péritoine d'un cobaye, entraîne la mort à la dose de 40 centimètres cubes. Besson a repris l'étude du poison septique ; il a utilisé des cultures filtrées à la bougie Chamberland, et aussi, après semblable filtration, de la sérosité recueillie sur des animaux venant de succomber à la septicémie expérimentale aiguë.

A. — Pour les cultures, il faut choisir un milieu permettant au microbe de fabriquer la plus grande quantité possible de matière toxique. Les cultures en bouillon ordinaire conviennent mal : elles sont très peu actives, et, après filtration, tuent difficilement le cobaye. On obtient de meilleurs résultats en utilisant le mode de culture suivant :

Dans un flacon de 1200 à 1500 centimètres cubes de capacité, on met 500 grammes de viande de bœuf hachée et quelques centimètres cubes d'une solution de soude à 1 p. 100 ; le flacon, bouché à l'ouate, est porté à l'autoclave à 115° C. pendant vingt minutes. Après refroidissement, on ensemence avec un peu de sérosité prise sur un cobaye mort de septicémie. Au bouchon de ouate, on substitue un bouchon de caoutchouc stérilisé portant deux tubes dont l'un plonge dans le contenu du flacon, se recourbe à angle aigu et se termine par une extrémité effilée : il servira à décanter le liquide, après culture. L'autre tube s'arrête à la partie supérieure du flacon ; à l'extérieur il est coudé à angle droit, renferme une bourre de ouate et porte un étranglement près de son extrémité. C'est à ce dernier tube que l'on adapte la machine à vide. Le vide fait dans le flacon, le tube est fermé d'un trait de chalumeau, au niveau de l'étranglement, et le flacon est porté à l'étuve à 37°. Au bout d'une vingtaine d'heures, de nombreuses bulles de gaz viennent crever à la surface de la bouillie pâteuse que contient le flacon, la viande prend une teinte rose vif caractéristique, et il tend à se former deux couches : dans un liquide trouble et rougeâtre, baigne une masse semi-solide, crevassée, irrégulière. Vers la fin du deuxième

jour, il est utile de casser avec une pince l'extrémité du tube que l'on a fermé au chalumeau : les gaz dégagés par la culture s'échappent immédiatement en sifflant, et une odeur infecte se répand dans la salle : ces gaz, formés en grande abondance et comprimés dans le flacon, gênent la culture et, faute de leur donner issue, on n'obtiendrait jamais qu'un produit peu toxique. Après leur évacuation la culture se produit à l'abri de l'air, le flacon étant constamment rempli, à la pression atmosphérique, par l'acide carbonique et l'hydrogène dégagés par le développement de la bactérie.

L'expérience a montré que le maximum de toxicité des cultures se rencontre vers le sixième jour, puis leur activité baisse rapidement : c'est donc à ce moment que le flacon sera retiré de l'étuve. La partie liquide est décantée, la partie solide est passée à la presse à viande et la sérosité obtenue est mêlée au produit de la décantation ; le tout est filtré sur une bougie Chamberland.

La toxine ainsi obtenue est beaucoup plus active que celle que préparaient MM. Roux et Chamberland. Avec une dose de 3 à 5 centimètres cubes injectés dans le péritoine, des cobayes de 450 à 600 grammes présentent une affection passagère, dont tous les symptômes rappellent les phénomènes terminaux de la septicémie, mais qui guérit rapidement. Une dose inférieure à 2 centimètres cubes ne donne lieu à aucune manifestation morbide. Des doses analogues ou plus considérables, injectées dans le tissu cellulaire sous-cutané ont beaucoup moins d'influence sur l'état général et ne font guère varier la température : mais, localement, elles produisent soit un œdème très marqué, soit une eschare.

Quand on injecte, à un cobaye ou à un lapin, de petites doses plusieurs fois répétées du produit de filtration d'une culture en viande, on observe une véritable intoxication chronique aboutissant à la mort.

L'injection intrapéritonéale de doses comprises entre 5 et 10 centimètres cubes tue rapidement des cobayes de 300 à 400 grammes.

L'addition de solution iodée semble modifier très peu les propriétés de la toxine septique. La chaleur a plus d'action : le chauffage des cultures à 80° et 100° diminue notablement l'activité du poison qui devient ainsi susceptible d'être toléré à des doses beaucoup plus fortes. Le vieillissement de la toxine à la température de 35°, à la lumière diffuse, en altère rapidement les propriétés. Il n'en est pas de même du vieillissement en vase clos, à l'abri de l'air et de la lumière, à la température du laboratoire : dans ces conditions, le poison conserve toute son activité.

Dans tous les cas où la mort succède à une injection intrapérito-

néale de toxine, on trouve, à l'autopsie, l'intestin congestionné, le péritoine rouge hortensia, et il existe un peu de sérosité stérile dans la cavité péritonéale.

B. Le produit obtenu en filtrant de la sérosité d'œdème de cobayes et de lapins récemment morts de septicémie s'est montré beaucoup moins actif que la toxine fournie par les cultures en viande. Injectée à la dose de 2 à 10 centimètres cubes dans le péritoine de cobayes de 280 à 350 grammes, cette sérosité filtrée a toujours été inoffensive. Chez le cobaye de 300 grammes environ, on obtient une maladie plus ou moins grave, mais aboutissant toujours à la guérison avec une dose de 15 à 20 centimètres cubes. La mort n'a été obtenue qu'après injection intrapéritonéale de 30 à 40 centimètres cubes.

Propriétés chimiotaxiques. — La toxine du vibrion septique possède des propriétés chimiotaxiques négatives. Des tubes capillaires sont emplis de toxine préparée en bouillon peptonisé; puis, avec un léger trait de chalumeau on les ferme à une extrémité : on obtient ainsi de petits tubes, longs de 2 à 3 centimètres, pleins de toxine et ouverts à un seul bout. Ces tubes sont introduits, au moyen de très petites incisions, sous la peau de lapins et de cobayes ; au bout de huit, dix et vingt heures, on les enlève et on examine leur contenu. Tandis que des tubes témoins renfermant un peu du bouillon qui a servi à la culture et introduits en même temps sous la peau, contiennent à ce moment un liquide louche, très riches en leucocytes, le contenu des tubes de toxine est resté limpide et l'examen microscopique n'y décèle aucun leucocyte. Ce n'est que pour des durées d'inclusion de vingt-quatre à trente heures que ces derniers tubes peuvent présenter des leucocytes, soit qu'au contact prolongé des tissus vivants les propriétés du poison aient subi des modifications, soit que la toxine ait diffusé et ait été remplacée par de la lymphe.

Le chauffage à 85° pendant deux à trois heures, modifie absolument les propriétés chimiotaxiques de la toxine : de négatives, elles deviennent positives, et les tubes insérés sous la peau des lapins et des cobayes ne tardent pas à se remplir de leucocytes.

IMMUNITÉ.

Roux et Chamberland sont parvenus à vacciner le cobaye en lui injectant à plusieurs reprises dans la cavité péritonéale de fortes doses de culture en bouillon chauffées dix minutes à 110°; après injections en trois fois à trois jours de distance de 120 centimètres cubes de culture chauffée, les animaux ont acquis l'immunité.

L'immunisation par injection de doses progressives de cultures

en viande filtrée est très laborieuse (Besson), le plus grand nombre des animaux ainsi traités succombent à une cachexie chronique.

Roux et Chamberland ont conféré l'immunité aux cobayes en leur injectant à sept ou huit reprises 1 centimètre cube de sérosité d'œdème septique filtrée sur la bougie Chamberland.

CHAPITRE III

LES STAPHYLOCOQUES PYOGÈNES

A côté du *staphylocoque doré*, découvert par Pasteur, sont venus se placer depuis deux autres staphylocoques pyogènes : le *staphylococcus pyogenes albus* et le *staphylococcus pyogenes citreus*. Ces trois bactéries ne diffèrent que par la coloration de leurs cultures; leurs propriétés biologiques sont les mêmes. Avec Rodet et Courmont, nous pensons qu'il ne faut voir en eux que trois races d'une même espèce et nous réunirons leur description dans un même chapitre. Nous prendrons le staphylocoque doré comme type et nous nous contenterons de noter, en temps utile, les particularités propres à ses deux congénères.

Les staphylocoques pyogènes sont très répandus dans la nature; on les rencontre dans l'air, dans certaines eaux, à la surface de la peau, des muqueuses, dans le tube digestif, sous les ongles, etc.

En pathologie, on les retrouve dans le pus, particulièrement dans le furoncle et l'ostéomyélite (Pasteur), divers abcès, les pustules d'ecthyma, etc. Dans certains cas de suppurations, le staphylocoque passe dans le sang, détermine l'infection purulente, la pyémie.

On a rencontré encore les staphylocoques pyogènes dans certaines pleurésies, péricardites ou péritonites suppurées et aussi dans l'endocardite ulcéreuse. Ils causent encore certaines broncho-pneumonies, les angines, etc. Ils se trouvent fréquemment associés au bacille tuberculeux dans les pleurésies et les méningites suppurées; ils compliquent la pelade, les tricophyties, etc.; on note souvent leur association au pneumocoque dans la pneumonie, au bacille de Löffler dans la diphtérie; ils favorisent le développement des spores du vibrion septique (Besson) et du bacille de la pourriture d'hôpital (Vincent).

On les rencontre dans un grand nombre de suppurations chez les mammifères et les oiseaux; le staphylocoque doré est l'agent d'une

ostéomyélite des jeunes oies (Lucet); il pourrait même se développer chez les poissons et il aurait causé une épidémie qui a sévi sur les goujons du Rhône (Charrin).

STAPHYLOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

Homme. — Garré a pu déterminer la production de furoncles par des frictions énergiques de la peau avec un tampon imbibé d'une culture de staphylocoque doré.

Lapin. — Le lapin est l'animal de choix pour les inoculations.

Inoculation sous-cutanée. — Quand on injecte sous la peau de cet animal un peu d'une culture virulente, il se produit un abcès, la température s'élève, puis l'abcès s'ouvre à l'extérieur, se vide et tout rentre dans l'ordre. D'ordinaire, l'animal ne succombe pas; rarement, la mort se produit par septicémie.

Inoculation intra-péritonéale. — Cette inoculation est beaucoup plus sévère; elle entraîne rapidement une péritonite suppurée à laquelle succombe l'animal. Le passage par le lapin exalte la virulence du staphylocoque; chez les animaux qui succombent on trouve le microbe dans le sang et les différents viscères.

Inoculations intra-pleurale, intra-articulaire. — Il se développe un épanchement purulent et l'animal succombe en peu de jours; si le staphylocoque est très virulent, il se produit une septicémie rapide qui entraîne la mort en vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Inoculation intra-veineuse. — Cette inoculation produit d'ordinaire des accidents graves. Dans les cas les plus sévères, le microbe envahit rapidement l'organisme et détermine une pyémie avec localisations suppuratives dans les viscères, particulièrement dans les reins; la mort arrive en vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Chez certains individus, et particulièrement si on a produit au préalable des lésions du cœur, cette inoculation détermine des endocardites ulcéreuses ou végétantes qui entraînent rapidement la mort (Wyssokowitch, Ribbert, Bonome).

Enfin Rodet et Lannelongue ont obtenu, par l'inoculation intraveineuse, des lésions d'ostéomyélite; l'ostéomyélite se produit très facilement quand on traumatise un os avant l'inoculation; on obtient fréquemment chez le lapin des ostéites juxta-épiphysaires analogues à celles de l'homme.

Cobaye, rat, souris, chien. — Ces animaux sont moins régulièrement sensibles que le lapin; chez eux, l'inoculation sous-cutanée produit un abcès; l'inoculation intra-péritonéale est susceptible de déterminer une septicémie mortelle.

Oie. — Lucet, en inoculant des oies avec le staphylocoque retiré de l'ostéomyélite des jeunes oies a pu reproduire chez les animaux d'expérience les lésions caractéristiques de la maladie. L'ingestion et l'inoculation sous-cutanée des cultures restent inactives, mais l'injection dans la veine de l'aile de cultures en bouillon ou de pus osseux produit la mort en trois à quatre jours. A l'autopsie, on trouve des ostéomyélites multiples; le foie est volumineux; le staphylocoque existe dans la moelle osseuse, le pus osseux, la pulpe splénique.

RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES.

Dans le pus, les humeurs, le sang, on recherche les staphylocoques de la façon suivante :

a). **Examen microscopique.** — Recueillir purement le pus ou les humeurs, et en préparer des lamelles qui, après dessiccation et fixation, seront colorées :

1° Les unes, avec une des solutions colorantes phéniquées (bleu de Kühne, thionine phéniquée, fuchsine de Ziehl diluée);

2° Les autres, par la méthode de Gram : le staphylocoque prend le Gram; par le procédé de la double coloration, on obtient, avec l'éosine comme colorant de fond, de très belles préparations.

b). **Cultures.** — Dans le pus et les divers exsudats, le staphylocoque peut être associé à divers microbes, ou bien les diverses races de staphylocoques peuvent se trouver mélangées : dans l'examen d'un pus, on devra toujours pratiquer des isolements. En règle, on fera plusieurs ensemencements :

1° On ensemence une goutte du liquide recueilli purement dans un tube de bouillon (culture totale).

2° Pour pratiquer des isolements, on charge une öse du liquide à étudier, et avec cette öse on ensemence en surface trois tubes de gélose, sans recharger l'öse, suivant la méthode indiquée p. 88; on obtient ainsi des colonies isolées, qu'il sera facile de différencier.

On pourrait encore ensemencer des plaques de gélatine, mais ce procédé exposerait à laisser passer inaperçus certains microbes, tels que le pneumocoque et le streptocoque, qui ne cultivent pas sur gélatine.

c). **Inoculations.** — Pour déterminer le degré de virulence des cultures obtenues, on les inocule sous la peau et dans le péritoine du lapin.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Coccus sphériques de 0,5 à 0,9 μ de diamètre, immobiles, rarement isolés ou associés en diplocoques ou en courtes chaînettes de deux ou trois éléments, ordinairement groupés en amas irréguliers de cinq ou



Fig. 132. — Staphylococcus pyogenes aureus (culture en bouillon). — Krystalviolet phéniqué (Reich. Obj. 1/12; Oc. III).

trente coccus, amas que l'on a comparés à des grappes. Ces coccus se colorent très facilement par toutes les couleurs d'aniline et prennent le Gram.

Ces caractères sont communs à toutes les races ou variétés de staphylocoques pyogènes.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Les staphylocoques cultivent entre + 15° et + 44°, sur tous les milieux de culture, à l'abri ou en présence de l'air.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES AUREUS.

Bouillon. — A 37°, trouble en douze ou vingt-quatre heures, puis précipité blanc abondant, le bouillon restant trouble; par la suite, le précipité prend une teinte jaunâtre qui peut aller jusqu'à l'orangé vif; la coloration peut se manifester très tardivement et être très

peu marquée. Dans les vieilles cultures, le staphylocoque doré perd parfois la propriété de fabriquer du pigment et devient alors identique au staphylocoque blanc.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20^c, en vingt-quatre ou trente-six heures, apparition d'une culture granuleuse le long de la piqûre; vers le cinquième jour, il se forme un entonnoir de liquéfaction, plein de liquide trouble et au fond duquel il se dépose un précipité blanc jaunâtre; l'entonnoir de liquéfaction s'élargit ensuite, atteint les bords du tube et prend peu à peu la forme d'un cylindre; il est rare que la liquéfaction atteigne le fond du tube. Il existe des variétés de staphylocoque doré avec lesquelles la liquéfaction est beaucoup plus tardive; nous possédons une de ces variétés, présentant d'ailleurs tous les caractères du staphylocoque doré et qui ne commence à liquéfier que vers le quinzième jour à 20^c; la liquéfaction reste minime.

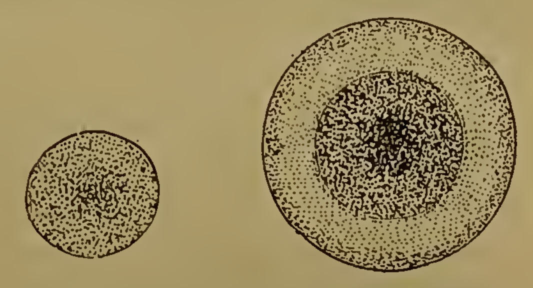


Fig. 133. — Micrococcus pyogenes aureus. — Cultures sur plaques. — 1, colonie de quarante-huit heures; 2, colonie de cinq jours.

Colonies isolées. — Au bout de deux à quatre jours à 20^c, petites colonies régulièrement arrondies, grisâtres avec le centre jaune; bientôt, autour de ces colonies, il se produit une liquéfaction annulaire; la zone liquéfiée s'étend plus ou moins rapidement; dans le liquide trouble nagent des flocons jaunes.

Gélose. — A 37^c, le long de la strie d'inoculation se produisent en vingt-quatre heures de nombreuses petites colonies blanches arrondies qui se réunissent rapidement pour constituer une large strie blanchâtre plus ou moins lisse et humide. Bientôt la strie se colore; sa coloration peut aller d'un jaune sale à peine marqué au jaune orangé vif; chez certaines cultures, la coloration ne commence à apparaître que vers le huitième ou dixième jour.

Sérum solidifié. — Mêmes caractères que sur gélose.

Pomme de terre. — C'est sur ce milieu que le staphylocoque doré donne la coloration la plus intense. Vers le deuxième ou quatrième jour à 37^c, il se produit une couche épaisse d'un jaune plus ou moins vif.

Lait. — Le staphylocoque pousse en coagulant rapidement le lait.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES ALBUS.

Mêmes caractères que le précédent, mais les cultures restent toujours blanches; sur *gélose*, la teinte est d'un blanc mat, porcelanique;

la liquéfaction de la *gélatine* est souvent plus lente qu'avec le staphylococcus aureus.

STAPHYLOCOCCUS PYOGENES CITREUS.

Mêmes caractères que le staphylococcus aureus, sauf la teinte des cultures qui est jaune citron.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Cultures. — Les staphylocoques sont aérobies facultatifs, ils poussent de $+15^c$ à $+44^c$; la température optima est au voisinage de 35^c-37^c; la température la plus favorable à la production des pigments doré et citrin est comprise entre 20^c et 25^c. La matière colorante ne se produit que dans les cultures aérobies; elle est moins abondante dans les cultures après de nombreux passages sur les milieux artificiels.

Vitalité. — Les staphylocoques ne forment pas de spores ; néanmoins, ils conservent fort longtemps leur vitalité dans les cultures : dans le bouillon, on les retrouve vivants après douze et seize mois.

Dans les cultures, les staphylocoques résistent mal à l'action de la chaleur ; ils sont tués par une exposition de vingt-quatre heures à $+55^c$ ou de quinze minutes à $+80^c$. Mais desséchées dans du pus, des substances albuminoïdes, ils peuvent résister plusieurs minutes dans la vapeur d'eau à 100^c.

Très sensibles aux antiseptiques quand ils sont pris dans les cultures, les staphylocoques sont beaucoup plus résistants quand ils se trouvent mélangés à des matières albuminoïdes desséchées.

Virulence. — La virulence du staphylocoque est soumise à des variations que rien ne peut permettre de prévoir. En général, cette virulence baisse considérablement dans les cultures anciennes; pour la conserver, il importe de faire fréquemment des réensemencements et, de temps en temps, des passages par le lapin. Les inoculations en série dans le péritoine des lapins exaltent la virulence du staphylocoque.

Le staphylocoque recueilli dans les milieux extérieurs se montre souvent inactif ; de plus, il arrive quelquefois que le staphylocoque que l'on vient d'isoler d'un foyer purulent chez l'homme soit absolument dépourvu de virulence vis-à-vis des animaux de laboratoire.

TOXINES.

Le staphylocoque, dans les cultures, produit des acides gras aux dépens des matières sucrées ; il transforme le lactose en acide lactique, et, dans certaines conditions, produit des acides acétique, valérianique, butyrique et propionique ; aussi les cultures présentent-elles rapidement une odeur aigre.

D'autre part, le staphylocoque produit de petites quantités d'indol et des diastases liquéfiant la gélatine et peptonisant le blanc d'œuf.

Enfin, dans les cultures, le staphylocoque produit des toxines.

I. — Christmas filtre sur la bougie Chamberland une culture de staphylocoque doré en bouillon, puis il précipite le filtrat par 4 ou 5 volumes d'alcool fort. Le précipité est jeté sur un filtre de papier, lavé à l'alcool, puis repris par l'eau. La solution obtenue a des propriétés phlogogènes peu marquées : injectée dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, elle produit une suppuration minime.

II. — Leber a pu extraire des cultures une substance soluble dans l'alcool, cristallisable, qui a des propriétés phlogogènes marquées et produit de la suppuration et même des nécroses des tissus au sein desquels elle est injectée ; Leber désigne cette substance sous le nom de phlogosine.

III. — Rodet et Courmont ont étudié plus complètement les produits toxiques du staphylocoque.

a). Des cultures en bouillon âgées de vingt jours environ (35^c) sont soumises pendant vingt-quatre heures à une température de $+ 55^c$, pour tuer les microbes, puis filtrées sur papier. Le filtrat est toxique pour le chien ; des symptômes d'empoisonnement se manifestent quand on en injecte une dose de $1^{cc},3$ par kilogramme d'animal, mais la mort ne survient rapidement (au minimum en dix-sept heures) que si l'on injecte dans la jugulaire la dose formidable de 35 centimètres cubes par kilogramme ; il se produit alors un abaissement de température, une tendance à l'arrêt de la respiration et du cœur, des vomissements, des convulsions et des tremblements.

Le lapin est encore moins sensible ; un lapin de 1900 grammes ayant reçu 10 centimètres cubes de culture chauffée n'est mort qu'au bout de six jours, après avoir présenté de l'amaigrissement et une diminution de poids.

La toxine obtenue est très altérable et perd rapidement ses propriétés par le vieillissement.

b). Une culture de vingt jours filtrée sur la bougie Chamberland s'est montrée moins toxique encore ; après injection intraveineuse

de doses atteignant 10 et 15 centimètres cubes, des lapins de 2 kilogrammes n'ont présenté qu'une élévation passagère de la température centrale sans perte de poids.

c). Des cultures âgées de vingt jours ont été décantées ; le liquide clair a été filtré sur plusieurs feuilles de papier, puis ce filtrat a été mélangé à 3 ou 4 fois son poids d'alcool fort ; le précipité recueilli sur un filtre, lavé à l'alcool et desséché, a été repris par l'eau.

1° La solution aqueuse obtenue s'est montrée peu toxique ; pour tuer en deux heures un chien de 6 kilogrammes, il a fallu en injecter dans les veines une quantité correspondant à 200 centimètres cubes de culture ; les symptômes observés ont été : dyspnée, rythme de Cheyne-Stokes, abaissement de la température centrale, tremblements, convulsions, contractures.

Le lapin résiste mieux que le chien ; il ne succombe pas à des doses correspondant à 40 et 50 centimètres cubes de culture ; avec le précipité fourni par 140 centimètres cubes de culture, la mort n'est survenue qu'au bout de huit jours.

2° D'un autre côté, la solution alcoolique séparée par le filtre du précipité albuminoïde et évaporée dans le vide a fourni un résidu qui a été repris par l'eau. Deux chiens de 9 kilogrammes n'ont pas succombé à l'injection intraveineuse de doses de cette solution correspondant à 260 et 500 centimètres cubes de culture ; un chien de 10 kilogrammes a succombé à une injection représentant 210 centimètres cubes de culture, après avoir présenté de l'anesthésie généralisée, l'abolition des réflexes, une résolution complète, enfin un arrêt du cœur et de la respiration.

Le lapin est peu sensible ; il n'a jamais succombé rapidement à l'inoculation des matières solubles dans l'alcool ; un lapin a survécu vingt jours à l'injection d'une dose représentant 85 centimètres cubes de culture.

De leurs expériences, les auteurs concluent que les substances solubles dans l'alcool, d'une part, et les substances insolubles dans ce liquide, d'autre part, injectées séparément sont plus toxiques que le mélange total. Ces deux substances auraient des effets antagonistes et se neutraliseraient partiellement dans les mélanges. La faible toxicité des produits obtenus par Courmont et Rodet rend ces appréciations fort délicates et les résultats qu'ils ont obtenus méritent confirmation.

IV. — Mosny et Marcano ont obtenu des cultures en bouillon qui, après filtration, tuaient les lapins en quelques secondes par injection intraveineuse à la dose de 10 centimètres cubes. A la dose de 1 à 2 centimètres cubes, le filtrat rend l'animal cachectique et la mort

survient en cinq à six semaines : les animaux qui survivent à l'inoculation de la toxine n'ont jamais présenté d'immunité contre le staphylocoque.

VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE.

Ces points de l'histoire du staphylocoque sont peu connus encore ; les travaux sont peu nombreux et ont fourni trop souvent des résultats contradictoires.

Mosny et Marcano ont échoué à vacciner le lapin en injectant de petites doses de toxine active.

D'après Courmont, la seule toxine soluble dans l'alcool jouirait de propriétés vaccinantes, les produits précipités par l'alcool prédisposant au contraire à l'infection ; en injectant la toxine soluble obtenue par la méthode que nous avons exposée plus haut, Courmont a pu obtenir une vaccination relative : le sérum des animaux ainsi traités paraît atténuer la virulence du staphylocoque ; de nouvelles recherches étaient nécessaires pour obtenir une démonstration complète.

Les travaux de Viquerat et Kosc et de Parascandolo ont abouti à l'obtention d'un sérum préventif ; ce sérum, obtenu en injectant des cultures virulentes en bouillon sucré stérilisées par addition de 5 p. 100 d'acide phénique serait antitoxique et microbicide.

Capman injecte à des lapins et à des chiens une culture filtrée de staphylocoques préparée en bouillon peptonisé à 1 p. 100 et âgée de vingt jours (37^{c}) ; après plusieurs injections de toxine, il laisse l'animal se reposer pendant quinze à vingt jours, puis il prélève du sang. Ce sang a des propriétés bactéricides et antitoxiques ; injecté à des lapins et à des cobayes, il les préserve et même les guérit de l'infection staphylococcique.

CHAPITRE IV

LE STREPTOCOQUE PYOGÈNE

Le streptocoque a été observé pour la première fois par Pasteur e Doleris, dans le sang de femmes atteintes de fièvre puerpérale.

Il cause un grand nombre de suppurations (Ogston, Passet, Rosenbach), la fièvre puerpérale (Pasteur et Doleris, Widal, Arloing), des phlébites; il est l'agent d'un grand nombre d'angines érythémateuses, pseudomembraneuses et phlegmoneuses (Prudden, Raskin, Veillon, Lemoine, etc.), de certaines broncho-pneumonies, pleurésies purulentes, péritonites, méningites, endocardites, otites, etc.; il cause fréquemment des ostéomyélites, l'infection purulente chirurgicale; enfin le streptocoque de l'érysipèle de Fehleisen est identique au streptocoque pyogène.

Le streptocoque est encore plus redoutable quand il s'associe à certaines bactéries pathogènes et entre en scène, au titre d'infection secondaire, au cours d'une maladie préexistante : il a la propriété d'exalter la virulence des microbes auxquels il s'associe; c'est ainsi qu'on le trouve associé au bacille spécifique dans la grippe (Vaillard et Vincent, Ribbert, Weichselbaum, Chantemesse et Vidal, etc.), dans la fièvre typhoïde (Vincent), dans la diphtérie (Lœffler, Behring, Roux et Martin). Il s'associe encore au pneumocoque, au bacille tuberculeux, au bacille de la pourriture d'hôpital; il cause un grand nombre des complications de la scarlatine, maladie dont on ne connaît pas encore le germe spécifique (Combemale et Lamy, Babès, Raskin, Kurth, etc.).

Le streptocoque se rencontre, à l'état normal, à la surface de la peau de l'homme, dans les cavités naturelles ouvertes au dehors (bouche, nez, vagin), dans la salive, etc.

Eiselsberg l'a trouvé dans l'air, Landmann, Vaillard dans de l'eau de puits; dans les milieux extérieurs le streptocoque semble perdre très rapidement sa virulence.

STREPTOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

Lapin. — Le lapin est l'animal de choix pour l'étude de la streptococcie expérimentale. Les cultures employées pour les inoculations doivent être âgées de deux à trois jours.

Inoculation sous-cutanée. — On la pratique d'ordinaire à l'oreille où l'on peut mieux suivre et étudier la marche des lésions.

Suivant le degré de virulence de la culture, l'injection de X à XX gouttes provoque :

a). Un petit abcès.

b). Une rougeur érysipélateuse fugace.

c). Un érysipèle étendu à la totalité de l'oreille et pouvant devenir phlegmoneux, sans entraîner de généralisation.

d). Un érysipèle phlegmoneux suivi d'arthrites suppurées et entraînant la mort en quinze à trente jours. Dans ce cas, à l'autopsie on ne retrouve pas le streptocoque dans le pus articulaire, ni dans le sang.

e). Une septicémie rapide entraînant la mort en quelques jours ; à l'autopsie on trouve le streptocoque dans le sang.

Inoculation intra-veineuse. — L'inoculation intra-veineuse avec un virus actif entraîne la mort en vingt-quatre ou quarante-huit heures par septicémie ; le streptocoque se trouve en abondance dans le sang.

Avec un virus peu actif on obtient des localisations suppurées sur les séreuses ; la guérison peut survenir ; la mort arrive fréquemment au bout de dix à vingt jours ; le streptocoque n'existe pas dans le sang.

Inoculation intrapéritonéale. — L'inoculation intrapéritonéale est aussi sévère que l'inoculation intraveineuse ; le streptocoque virulent tue le lapin en vingt-quatre ou soixante-douze heures.

Les passages en série par le lapin exaltent indéfiniment la virulence du streptocoque (Marmorek, Gromakowsky) ; par cette méthode, Marmorek a pu obtenir un streptocoque dont l'injection intrapéritonéale tue le lapin à la dose de un millionième et même un milliardième de centimètre cube.

Souris. — La souris présente à peu près la même sensibilité que le lapin. Après inoculation sous-cutanée, la souris meurt d'ordinaire en vingt-quatre ou soixante-douze heures si le streptocoque est virulent, et plus lentement, après avoir présenté des complications suppuratives, si le microbe est peu actif.

Cobaye. — Le cobaye est peu réceptif, après inoculation sous-cutanée d'un streptocoque actif il fait d'ordinaire un abcès et guérit.

Le streptocoque exalté de Marmorek injecté dans le péritoine du cobaye à la dose minima de 2/10 de cc., tue cet animal en quinze à vingt heures environ par péritonite purulente avec pénétration des microbes dans le sang.

Grands animaux. — L'âne est assez sensible ; le cheval, le mouton et enfin le chien le sont à un très faible degré.

RECHERCHE DU STREPTOCOQUE.

Examen microscopique. — Le streptocoque sera recherché dans les lamelles préparées avec le pus, le sang, les sérosités. Les lamelles sont colorées d'une part avec le krystalviolet ou la thionine phéniqués, d'autre part par la méthode de Gram.

Les coupes d'organes, de peau érysipélateuse, etc., sont fixées au sublimé acide et à l'alcool absolu ; on les colore de préférence par la méthode de Gram (double ou triple coloration).

2° **Cultures.** — Le sang sera ensemencé en bouillon et sur gélose.

Pour le pus, il est souvent nécessaire de faire un isolement en surface sur trois tubes de gélose (p. 88) pour obtenir des colonies séparées dans les cas où il existerait des associations.

Pour obtenir une culture pure en partant d'un érysipèle, on aseptise la peau comme il a été dit page 188, puis on pratique une piqûre à la lancette; les premières gouttes de sang qui sourdent sont essuyées avec un morceau de papier filtre stérilisé, puis on comprime, entre le pouce et l'index, la peau autour de la piqûre et on aspire avec une pipette la gouttelette de sérosité qui fait issue par celle-ci; on ensemence en bouillon cette sérosité.

3° **Inoculations.** — Pour déterminer la virulence du streptocoque, on peut inoculer directement au lapin le pus ou la sérosité contenant le microbe; il est préférable de faire une culture en bouillon ou en bouillon-sang et de l'inoculer quand elle est âgée de deux jours.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le streptocoque se présente sous la forme de coccus immobiles associés en chaînettes.

Les coccus mesurent 0,6 à 1 μ de diamètre, dans le sang et dans le pus. Dans les cultures les dimensions des grains sont assez variables ; ceux-ci présentent souvent une forme légèrement ovalaire.

Les chainettes, dans le streptocoque type (streptococcus erysipe-atis de Fehleisen, streptococcus pyogenes de Rosenbach), sont onstituées dans le pus, le ang, les cultures sur mi-ieux solides, par l'associa-ion de 6 à 15 grains, et dans es cultures en milieux li-quides par un nombre beau-coup plus considérable de grains (15 à 40 et plus).



Fig. 134. — Streptococcus pyogenes (pus d'empyème). — Méthode de Gram (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

Mais il n'y a rien de va-iable comme le nombre de grains des chainettes et nème la forme des grains, ussi a-t-on décrit plusieurs aces de streptocoques : le *treptococcus tenuis* de Veil-on, rencontré dans cer-taines angines, est consti-ué par des coccus très petits, ovoïdes, associés en courtes chaînes e deux à six éléments ; le *streptococcus brevis* de Lingelsheim, ren-ontré dans la salive, des ausses membranes d'angines, ertains pus, est constitué par es éléments analogues à ceux u streptocoque de Fehleisen, nais toujours réunis en di-locoques ou en chaînettes e quatre à six articles, con-tituées par des réunions de iplocoques. Kurth a décrit omme agent pathogène de a scarlatine un streptocoque, *treptococcus conglomeratus*, ca-actérisé par la tendance des ongues chaînettes à s'agglo-mérer sous forme d'amas ana-ogues à ceux des staphylo-oques (fig. 136 à 139).



Fig. 135. — Streptococcus pyogenes (culture en bouillon). — Krystalviolet phéniqué (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

Beaucoup d'auteurs identifient ces divers streptocoques et ne les onsidèrent que comme des formes accidentelles d'une seule et nème espèce. Marmorek qui soutient cette opinion a montré que

l'on pouvait faire varier le nombre, la forme et la disposition des éléments des streptocoques en produisant des modifications dans la composition des milieux de culture.

Coloration. — Le streptocoque pyogène se colore facilement par



Fig. 136. — Formes à éléments très petits.

Fig. 137. — Formes en diplocoques.

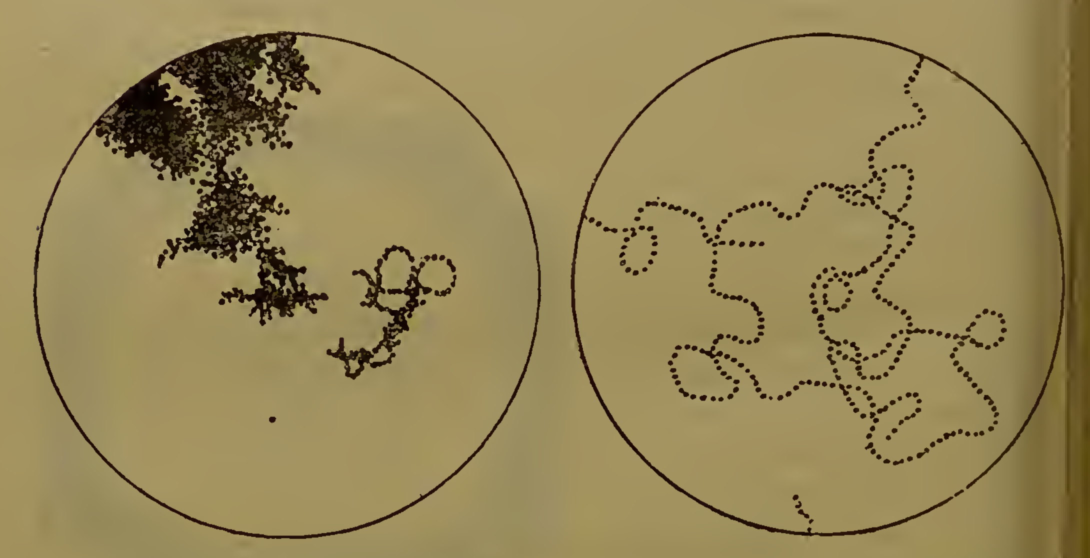


Fig 138. — Formes agglomérées (streptococcus conglomeratus).

Fig. 139. — Formes très longues.

Fig. 136 à 139. — Diverses formes du streptocoque pyogène.

les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Il faut cependant admettre quelques exceptions à la deuxième partie de cette règle : le streptocoque décrit par Lingelsheim ne se colore pas par la méthode de Gram ; il en est de même d'un streptocoque rencontré par Etienne dans une angine ; Linossier a retiré d'un érysipèle un strep-

tocoque qui, tantôt prenait le Gram, tantôt se décolorait quand on le soumettait à cette réaction. Il serait intéressant de faire subir à ces races le contrôle de la coloration par la méthode de Claudius.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le streptocoque est facultativement aérobie. Il commence à se développer à + 18°, mais la culture est insignifiante entre + 18° et + 20°; le développement s'arrête vers 46°; la température optima de culture est de 37°-38°. Le streptocoque préfère les milieux additionnés de sérum ou de sang et exige une neutralisation exacte ou une légère alcalinisation des milieux de culture.

Bouillon. — Le streptocoque type ne trouble pas le bouillon; à 37°, au bout de vingt-quatre heures, il produit sur la paroi du tube un léger dépôt floconneux adhérent; vers le troisième ou quatrième jour ces petits flocons deviennent plus volumineux, puis ils tombent au fond du vase et y forment un dépôt grisâtre assez abondant; toujours le bouillon reste clair et prend une réaction assez fortement acide (acide lactique).

Certains streptocoques, en particulier les formes courtes, donnent des cultures troubles vers la vingt-quatrième heure à 37°, puis des grumeaux se forment, et vers le troisième ou cinquième jour le liquide s'éclaircit par précipitation d'un dépôt au fond du tube.

Sérum liquide. — Le sérum liquide pur provenant soit du liquide d'ascite, soit du sang du bœuf ou du cheval convient assez mal au streptocoque qui y donne des cultures de même aspect que celles en bouillon, mais plus grêles; au contraire le sérum frais de lapin permet le développement de cultures très abondantes.

Bouillon-sérum et bouillon-sang. — Marmorek a recommandé les milieux suivants qui permettent d'obtenir des cultures abondantes et virulentes.

1° Bouillon peptonisé, une partie; sérum de sang humain, une partie (Voy. p. 286); ce milieu est le plus favorable.

2° Bouillon peptonisé, une partie; sérum d'ascite ou de pleurésie, une partie.

3° Bouillon peptonisé, une partie; sérum d'âne ou de mulet, deux parties.

4° Bouillon peptonisé, une partie; sérum de cheval, deux parties.

Les caractères des cultures sont analogues à ceux que nous avons décrits plus haut.

Lait. — Le streptocoque cultive dans le lait qu'il coagule d'ordi-

naire en quatre ou cinq jours; la coagulation est parfois plus lente et peut même manquer.

Gélatine. — La piqûre dans un tube de gélatine donne une culture grêle, constituée par de petits points blancs opaques, arrondis, restant isolés les uns des autres et arrivant à peine à atteindre le volume d'une tête d'épingle. Il ne se produit jamais de liquéfaction; tout développement s'arrête vers le cinquième jour; la culture meurt en peu de temps.

Gélose. — A 37° il se forme, au bout de douze ou vingt-quatre heures, le long de la strie un léger semis de petites colonies très fines, blanchâtres, que l'on a comparées à des grains de semoule; rapidement ces colonies augmentent de volume, elles peuvent devenir confluentes et former une bande peu épaisse, semi-opaque, grisâtre, à bords plus ou moins découpés. La vitalité de la culture disparaît rapidement.

Sérum solidifié. — Culture analogue à la précédente; les colonies restent plus fréquemment isolées.

Marmorek recommande l'usage de gélose à la surface de laquelle on étend un peu de sérum humain.

Pomme de terre. — Il ne se produit pas de culture apparente, mais en raclant la surface de la pomme de terre on constate une multiplication évidente dans le produit de raclage examiné au microscope; les chaînettes restent toujours très courtes.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Virulence. — Le streptocoque se conserve mal dans les cultures aérobies; les réensemencements restent stériles dès la seconde semaine.

Au bout de deux ou trois passages successifs sur gélose, la culture ne se développe plus. En bouillon on peut obtenir des passages beaucoup plus nombreux, mais la virulence du microbe disparaît rapidement.

On arrive à maintenir la virulence en conservant le streptocoque à l'abri de l'air ou dans du bouillon additionné de carbonate de chaux ou plus certainement encore dans les milieux de Marmorek au sérum; dans ces derniers milieux les cultures successives n'exaltent pas la virulence du microbe, mais celui-ci conserve son activité pendant plusieurs générations. De plus, des cultures sur gélose, paraissant mortes quand on les ensemence dans les milieux ordinaires, se montrent vivantes et pullulent quand on les reporte en bouillon-sérum.

Un streptocoque fourni par un foyer de suppuration, une angine, chez l'homme, peut se montrer dépourvu de toute propriété pathogène vis-à-vis du lapin ; c'est le cas des streptocoques décrits par Veillon (streptococcus tenuis) et par Lingelsheim (streptococcus brevis).

Exaltation de la virulence. — *a*) Achalme a montré que l'on augmente la virulence d'un streptocoque en l'inoculant au lapin en même temps qu'une culture stérilisée de *proteus vulgaris.*

b) Vincent a constaté que l'association au bacille typhique exalte la virulence du streptocoque : un streptocoque qui, injecté à la dose d'un quart de centimètre cube dans les veines du lapin, ne détermine pas de fièvre, entraîne la mort par septicémie généralisée chez un sujet qui a reçu avant l'inoculation une injection de culture de bacille d'Eberth ; bien plus, les cultures de bacille typhique stérilisées par filtration et injectées en même temps que le streptocoque rendent celui-ci beaucoup plus actif : on peut arriver à tuer par septicémie streptococcique un animal aussi résistant que le cobaye en lui injectant dans le péritoine 2 centimètres cubes d'une culture filtrée de bacille d'Eberth mélangés à 1 centimètre cube d'une culture de streptocoque non exalté.

c) Marmorek, pour la préparation des toxines, exalte la virulence du streptocoque par les passages en série chez les lapins. C'est ce procédé que l'on devra utiliser pour obtenir un virus très actif ; on opérera de la façon suivante :

Inoculer dans la veine auriculaire d'un lapin une dose mortelle de la culture en bouillon du streptocoque à exalter. Dès que l'animal est mort, ensemencer le sang du cœur dans un tube bouillon-sérum humain ; après quarante-huit heures de séjour à 37^{c}, inoculer la culture à un deuxième lapin ; la culture ensemencée avec le sang de ce deuxième lapin servira à en inoculer un troisième ; on continuera ainsi indéfiniment la série, c'est une condition indispensable pour conserver la virulence du microbe. Après deux mois de passages' Marmorek a obtenu une culture en bouillon-sérum si active qu'elle tue encore le lapin à la dose de 1 cent-milliardième de centimètre cube : cette dose infinitésimale, diluée dans 1 gramme de bouillon et injectée dans le péritoine d'un lapin, amène la mort en trente heures par septicémie.

Résistance aux agents de destruction. — Dans les cultures le streptocoque est tué par une exposition d'une heure à 58^{c}, il ne résiste que quelques instants à 100^{c} ; il est très sensible aux antiseptiques, même les moins énergiques, les vapeurs de chloroforme, par exemple, stérilisent presque instantanément les cultures.

Dans le pus, principalement quand il est desséché, le streptocoque est plus résistant; il est tué en quelques minutes par une exposition à la température de 100^c, mais il supporte assez longtemps l'action des antiseptiques usuels.

PRODUITS TOXIQUES.

I. — Roger cultive le streptocoque à 30^c dans du bouillon de viande à l'abri de l'air; au bout de quinze jours la culture est filtrée sur la bougie Chamberland. Le filtrat injecté dans les veines du lapin, à la dose de 15 à 20 centimètres cubes par kilogramme, le tue en deux jours avec de la diarrhée et de l'amaigrissement. Des lapins ayant reçu 5 à 12 centimètres cubes de culture filtrée, inoculés plus tard du quinzième au trentième jour) avec une culture virulente moururent plus vite que les animaux témoins.

Au contraire, le même liquide chauffé à 104^c et injecté dans les veines à la dose de 5 à 30 centimètres cubes confère l'immunité aux lapins. Il y aurait donc deux produits dans la culture, l'un, précipitable par l'alcool et détruit à 104^c, serait toxique et prédisposant. l'autre résistant à 104^c serait immunisant.

II. — Marmorek ensemence le microbe exalté en bouillon-sérum humain ; la culture est filtrée sur la bougie au bout de trois mois: le filtrat injecté à un lapin de 2 kilos à la dose de 1 centimètre cube, le tue sûrement en trois à quatre jours. L'activité de la toxine est diminuée par le chauffage à 58^c.

IMMUNITÉ.

I. **Par la toxine.** — Roger a réussi à vacciner le lapin en lui injectant à plusieurs reprises des cultures stérilisées à 104^c-120^c. Les animaux immunisés par ce procédé n'atteignent jamais un degré d'immunisation comparable à celui qu'ils acquièrent au moyen des cultures vivantes (Marmorek).

Marmorek a essayé d'immuniser le cheval en lui injectant des quantités progressives de sa toxine tuant le lapin à la dose de 1 centimètre cube ; un cheval de 300 kilos a reçu 1 260 grammes de cette toxine en quatorze injections en deux mois; la réaction fut peu marquée et le sérum fourni par l'animal se montra très insuffisant.

II. **Par les cultures vivantes.** — Ce procédé est le plus certain et le plus rapide.

Lapin. — Marmorek a vacciné des lapins en leur inoculant d'abord des cultures anciennes, puis des cultures virulentes à doses progressives; les animaux les mieux vaccinés ont été ceux qui ont reçu

d'emblée sous la peau de l'oreille une culture assez virulente pour leur donner un érysipèle intense; un certain nombre d'animaux succombent à cette première inoculation; jamais cependant les animaux vaccinés solidement par ce procédé n'ont résisté à l'inoculation du streptocoque exalté actif au cent-millionième. Le sérum de ces lapins, actif contre le streptocoque qui a servi à l'immunisation, est dépourvu de toute influence sur le streptocoque exalté.

Mironof a obtenu des résultats analogues en donnant à des lapins, d'abord des cultures stériles, puis des cultures virulentes à doses progressives.

Gromakowsky a vacciné des lapins par un procédé mixte en leur inoculant dans le péritoine d'abord une culture ancienne chauffée à 100°, puis une culture ancienne non chauffée (5 à 10 centimètres cubes) et enfin des doses croissantes (1 à 10 centimètres cubes) de cultures virulentes. Entre chaque inoculation il met un intervalle de quinze jours environ et fait une quinzaine d'injections ; les animaux arrivent à supporter dans le péritoine 30 centimètres cubes d'une culture virulente.

Grands animaux. — Marmorek a immunisé l'âne, le cheval et le mouton en leur injectant sous la peau des doses faibles de culture d'un streptocoque extrêmement actif et en répétant les injections à doses croissantes dès que l'animal est rétabli; chaque inoculation doit être suivie d'une réaction énergique.

Cheval. — Dès le début, injecter sous la peau de l'encolure 0,75 à 2 centimètres cubes de culture virulente en bouillon-sérum (quand il faut de grandes quantités de culture on remplace le sérum de sang humain par du sérum d'ascite ou du sérum d'âne); la réaction est violente, la température s'élève jusqu'à 40° et il se produit un œdème dur au point d'inoculation. Pour obtenir un sérum efficace il est nécessaire de provoquer ces réactions énergiques. Après rétablissement complet de l'animal on inocule une dose double (5 centimètres cubes par exemple) de la culture virulente ; peu à peu on arrive à faire tolérer à l'animal des doses de 40 centimètres cubes et au-dessus.

Ane. — L'âne est beaucoup plus sensible et réagit très violemment : une dose de 5 centigrammes d'une culture tuant le lapin à la dose de 1 milligramme amena une réaction intense dans une observation de Marmorek; il est bon de débuter par des cultures moins virulentes; les doses doivent être augmentées très lentement.

SÉROTHÉRAPIE.

Le sérum des chevaux immunisés a été étudié par Roger et surtout par Marmorek.

Quand on immunise un cheval par injection de cultures vivantes, pendant toute la durée de la réaction, le sang ne contient pas de streptocoques, mais il est toxique : un lapin meurt en huit jours après injection de 2 centimètres cubes de sérum recueilli en période fébrile chez un cheval déjà bien immunisé ; le sérum provenant de chevaux en état de vaccination moins avancé et recueilli alors que la fièvre était tombée depuis quinze jours, faisait périr les lapins de 1500 grammes dans un délai de cinq à dix jours à la dose de 1 demi-centimètre à 1 centimètre cube. Mais à partir de la troisième semaine après la dernière inoculation, le sérum n'est plus toxique ; dès ce moment, et mieux encore à la quatrième semaine, il manifeste un pouvoir curatif et préventif très accusé (Marmorek).

Marmorek utilise de préférence le cheval comme producteur de sérum ; le cheval immunisé doit recevoir des quantités considérables de cultures virulentes (Voy. plus haut) ; quand il aura reçu au moins 2 litres de culture donnée par doses croissantes en six à douze mois, le cheval fournira un sérum énergique ; la récolte du sang ne devra être pratiquée que quatre semaines après la dernière inoculation. (Voy. *Diphtérie* pour les détails de la préparation du sérum.)

Le sérum ainsi obtenu ne manifeste *in vitro* aucun pouvoir bactéricide vis-à-vis du streptocoque ; les streptocoques qu'on y ensemence ne poussent ni très rapidement ni très abondamment, mais le sérum de cheval neuf ne se distingue pas à cet égard de celui qui provient des chevaux immunisés ; mélangé au sérum de lapin neuf il n'empêche pas le développement du microbe : la culture se produit aussi rapidement et est aussi abondante que dans un mélange de sérum de lapin et de sérum de cheval neufs ; le streptocoque cultivé dans le mélange sérum-lapin et sérum-cheval immunisé garde toute sa virulence (Mironoff, Bordet). Le sérum de cheval immunisé présente à un très faible degré la propriété agglutinative : l'agglutination n'apparaît, et encore reste-t-elle très minime, que quand on mélange à une culture un tiers au moins de son volume de sérum (Bordet).

Le sérum de cheval immunisé est antitoxique : 1 centimètre cube de toxine tuant le lapin en quarante-huit ou soixante-douze heures devient incapable de tuer un lapin de même poids quand on y ajoute 3 à 5 centimètres cubes de sérum.

Le sérum est énergiquement préventif : à la dose de 2 centimètres cubes, injectée sous la peau de lapins vingt-quatre heures avant l'inoculation de un millionième de centimètre cube d'une culture tuant sûrement au dix-millionième, il préserve ces animaux ; la

propriété préventive se manifeste avec une dose de sérum égale à la sept-millième partie du poids de l'animal.

Le sérum préventif a des propriétés curatives ; un centimètre cube de sérum préserve un lapin infecté depuis trois heures avec une dose dix fois mortelle de virus exalté ; 5 centimètres cubes guérissent des lapins inoculés depuis cinq heures ; quand six heures se sont écoulées depuis l'inoculation avec le virus exalté, le sérum est impuissant à enrayer l'infection ; au contraire, avec les streptocoques de virulence ordinaire, le sérum amène la guérison même après vingt-quatre et trente heures.

Le sérum de Marmorek a été employé chez l'homme (Chantemesse, Roger, etc.), pour combattre l'érysipèle et les autres affections à streptocoques ; les résultats n'ont pas été aussi satisfaisants qu'on pouvait l'espérer et trop souvent le sérum s'est montré inactif; les doses employées ont été de 10 centimètres cubes répétées au besoin chaque jour, pendant une semaine et plus; dans les cas graves, 20 centimètres cubes ont été injectés d'emblée. Il faut peut-être attribuer l'irrégularité de l'action du sérum à l'existence de races multiples de streptocoques.

Dans la scarlatine, l'usage du sérum de Marmorek a donné des résultats encourageants mais non concluants.

Dans les angines diphtéritiques avec association de streptocoque, Roux a essayé d'adjoindre au sérum antidiphtérique le sérum de lapins immunisés contre le streptocoque par Marchoux; ces essais n'ont pas été couronnés de succès ; Martin a obtenu de meilleurs résultats en combinant le sérum de cheval de Marmorek au sérum antidiphtérique. Marmorek, enfin, a essayé d'obtenir un sérum à la fois antidiphtérique et antistreptococcique en immunisant contre le streptocoque des chevaux déjà vaccinés contre la diphtérie ; ces chevaux résistent à merveille aux inoculations de streptocoque et présentent une réaction minime même sous l'influence de doses considérables de cultures exaltées ; Marmorek n'a pas encore fait connaître les résultats obtenus avec le sérum des animaux ayant subi ces immunisations combinées.

CHAPITRE V

LE GONOCOCCUS NEISSERI

Le gonocoque est l'agent de la blennorragie (Neisser) ; on le rencontre dans l'écoulement urétral, dans le pus des vaginites et des différentes complications génitales de la blennorragie (bartholinites, salpingites, métrites) ; il détermine certaines cystites, des affections suppurées du petit bassin chez la femme, l'ophtalmie blennoragique et l'ophtalmie purulente des nouveau-nés. Hallier l'a rencontré dans le sang d'individus atteints de rhumatisme blennorragique ; Petrone et Kammerer l'ont isolé dans le pus d'arthrites blennorragiques, mais la plupart des auteurs ont échoué à le déceler dans les articulations atteintes de rhumatisme blennorragique.

Pendant la première période de la blennorragie, le gonocoque se trouve d'ordinaire à l'état pur dans l'urètre, mais bientôt il se produit des infections secondaires et de nouveaux microbes viennent s'associer au gonocoque ou même se substituer à lui ; c'est ainsi qu'on rencontre les microbes de la suppuration, le bacterium coli, des diplocoques et divers microbes décrits par Bumm, Eraud et Hugounenq, Legrain, Eisenberg, etc. Ces microbes associés peuvent causer diverses des complications de la blennorragie : abcès, suppurations, endocardites, etc.

INOCULATIONS.

Homme. — *a*) Welander a déterminé une blennorragie chez l'homme en injectant dans l'urètre du pus à gonocoques.

b) Bumm, inoculant un peu d'une culture pure de gonocoques dans l'urètre d'une femme, produisit une blennorragie typique qui dura trois semaines ; le pus de l'urètre contenait le microbe spécifique.

c) Bockart a injecté dans l'urètre d'un paralytique général à la dernière période un centimètre cube d'une quatrième culture de

gonocoque sur gélatine. Il en résulta une blennorragie typique suivie d'une néphrite suppurée, le gonocoque se retrouvait dans le pus de l'urètre et des abcès du rein.

d) Bokaï inocula des cultures pures dans l'urètre de six étudiants et obtint six fois une blennorragie typique. Brenner, Wertheim, Finger, Schlagenhaufer, Kiefer, obtinrent également des résultats positifs.

Animaux. — Les animaux sont peu sensibles à l'inoculation du gonocoque et ne contractent d'ordinaire sous son influence aucune maladie spéciale.

L'inoculation sous-cutanée produit une inflammation passagère non suivie d'abcès (Wertheim). Finger a cependant obtenu une fois un petit abcès.

Les inoculations urétrales peuvent produire la blennorragie chez le chien ; elles échouent, comme les inoculations conjonctivales, chez le lapin, le cheval et le singe. Legrain a obtenu chez le cobaye une légère conjonctivite purulente avec des gonocoques à l'intérieur des cellules de pus.

En pratiquant l'inoculation de cultures dans les articulations, Finger, Schlagenhaufer ont produit, chez le lapin, des arthrites aiguës de peu de durée.

RECHERCHE.

On recherche le gonocoque dans le pus de l'urétrite et des diverses suppurations blennorragiques.

Pour recueillir le pus urétral, après désinfection du méat, on fait sourdre une goutte de pus en comprimant la verge de la racine à l'extrémité et on recueille cette gouttelette avec une pipette ou une öse.

a) **Examen microscopique.** — Dans la préparation des lamelles de pus, il faut avoir soin de ne pas comprimer fortement la goutte de pus entre les deux lamelles et d'opérer très doucement la séparation de celles-ci (Voy. p. 207), de façon à ne pas briser les cellules de pus, ce qui mettrait les gonocoques en liberté et leur ferait perdre un de leurs meilleurs caractères. On colorera la préparation selon les procédés exposés plus loin, de manière à différencier le gonocoque des espèces associées.

b) **Cultures.** — Pour obtenir des cultures, il est bon de prélever le pus pendant les premiers jours de l'urétrite ; plus tard, la production d'infections secondaires rendrait la recherche moins aisée. On pratiquera de préférence l'ensemencement en stries sur des plaques

de gélose au sérum, de façon à obtenir des colonies séparées; on peut aussi faire un isolement par la méthode ordinaire sur plaques de gélatine acide (Voy. p. 286).

Remarque. — Dans la blennorragie chronique, alors que l'écoulement est réduit à une simple goutte, le meilleur procédé pour rechercher le gonocoque consiste à faire uriner le malade, au réveil, dans un verre conique; on ajoute un fragment de thymol et on laisse au repos. Bientôt des filaments blanchâtres de mucus ou de muco-pus se déposent au fond du verre; on prélève de ces filaments avec une pipette et on en prépare des lamelles que l'on traite comme plus haut.

Ce mode de recherche ne se prête pas à l'obtention des cultures; pour obtenir celles-ci, il faudrait recueillir purement l'urine dans un verre stérile, y prélever immédiatement un filament avec une pipette stérile et l'ensemencer sur gélose au sérum.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le gonocoque se présente sous forme de petits grains ayant l'aspect de reins ou de haricots; leur diamètre varie de 0,4 à 0,6 μ; ils sont d'ordinaire réunis par deux, les éléments accouplés se regardent par leur face concave; quelquefois, on trouve des groupements en amas, mais jamais de chaînettes.

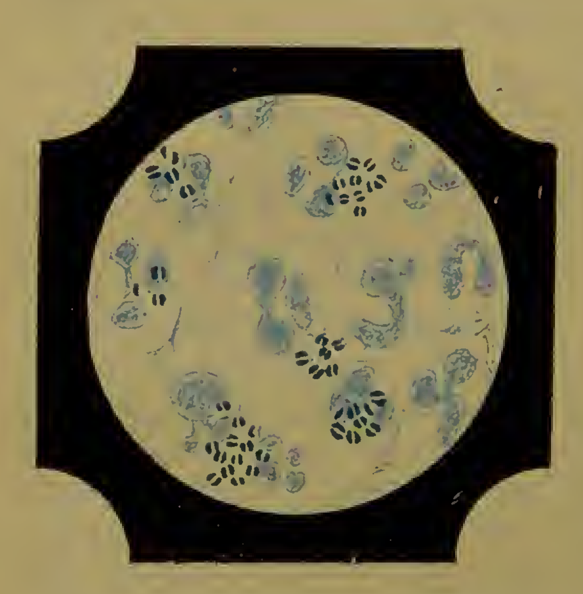


Fig. 140. — Gonococcus Neisseri (pus de blennorragie). — Bleu de Kühne (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

Les deux éléments d'un couple sont réunis par une gangue muqueuse analogue à la capsule du pneumocoque, très difficilement visible; on arrive à la colorer dans les cultures âgées en se servant de la fuchsine de Ziehl.

Dans les cultures, les gonocoques présentent des mouvements d'oscillation et de translation (Eraud et Hugounenq).

Dans le pus blennorragique, les gonocoques sont quelquefois libres, mais plus souvent contenus dans les cellules de pus ou les

cellules épithéliales; cette inclusion du gonocoque dans les cellules constitue une des caractéristiques de ce microbe.

Dans le pus de l'urétrite, le gonocoque se rencontre à l'état de pureté pendant les premiers jours; au début, les microbes sont peu nombreux et se trouvent dans les leucocytes polynucléaires; les cellules épithéliales abondent, mais un très petit nombre d'entre elles contiennent des microbes; vers le troisième jour, le nombre des gonocoques augmente, beaucoup de cellules du pus contiennent le microbe; bientôt après les cellules épithéliales disparaissent, un à cinq sur six des globules de pus renferment des gonocoques, très peu de ceux-ci sont libres. Dès ce moment, on peut constater l'entrée en jeu de microbes associés. Plus tard, les cellules épithéliales redeviennent très nombreuses, peu d'entre elles contiennent le gonocoque; ce n'est que quand l'écoulement passe à l'état chronique que les cellules épithéliales présentent de nouveau de nombreux microbes à leur intérieur, les globules du pus disparaissent alors presque complètement.

Coloration. — Le gonocoque se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline, mais il ne prend pas le Gram. L'absence de coloration par la méthode de Gram est très importante et doit toujours servir de base au diagnostic (G. Roux).

a) Faire d'abord une coloration simple au moyen de la fuchsine de Ziehl diluée ou de la thionine phéniquée; tous les microbes de la lamelle se colorent.

b) Colorer une lamelle au violet phéniqué, l'examiner, puis lui faire subir la méthode de Gram; les gonocoques se décolorent, seuls les microbes associés tels que les staphylocoques, le diplocoque décrit par Legrain, Bumm, etc., restent colorés.

c) Faire subir à une lamelle la double coloration par un des procédés suivants : on fait une méthode de Gram, les microcoques résistant au Gram sont seuls colorés, puis on fait agir une solution colorante autre que le violet et les gonocoques prennent cette deuxième teinte.

Procédé de Steinschneider. — 1° Faire agir le violet d'Ehrlich, puis la solution de Gram, décolorer à l'alcool absolu, laver à l'eau.

2° Faire agir alors pendant une minute une solution aqueuse de vésuvine; laver, sécher, monter.

Les gonocoques et le fond sont colorés en brun, les microbes résistant au Gram ont une teinte violette.

Procédé de Nicolle (procédé recommandé). — 1° Faire agir le violet phéniqué, le liquide de Gram, puis décolorer par l'alcool-acétone (p. 213), laver à l'eau.

2° Faire agir alors pendant quelques secondes une goutte d'une solution hydro-alcoolique de fuchsine :

Solution saturée de fuchsine dans l'alcool à 95°.	5 centimètres cubes.
Eau distillée......................................	100 —

Laver, sécher, monter.

Les gonocoques sont colorés par la fuchsine, les autres microbes sont violets.

CULTURES.

Conditions de culture. — Le gonocoque cultive assez difficilement et exige des milieux spéciaux. Il se développe entre + 21° et + 39°, la température optima est comprise entre + 35° et + 37°.

Bouillon. — Dans le bouillon ordinaire à 35°-37°, le développement est insignifiant ; vers le deuxième jour, il se produit un trouble très léger, puis un léger dépôt grisâtre se précipite et le liquide s'éclaircit.

Urine (Finger). — Dans l'urine non alcalinisée, additionnée de 0,5 p. 100 de peptone et stérilisée, le gonocoque se développe mieux que dans le bouillon ; il produit un trouble notable et un précipité assez abondant.

Gélatine acide (Turro). — Le gonocoque se développe assez bien à + 22° sur la gélatine acide (gélatine ordinaire non alcalinisée), mais ses cultures sont très fragiles et le développement s'arrête dès le troisième ou quatrième passage.

Piqûre. — Au bout de plusieurs jours, apparition d'une très légère ligne blanche le long de la piqûre ; la culture reste maigre ; il ne se produit jamais de liquéfaction de la gélatine.

Colonies isolées. — Petites colonies punctiformes, saillantes, blanches, à surface hémisphérique, restant très limitées.

Sérum. — Les milieux à base de sérum donnent les meilleurs résultats pour la culture du gonocoque ; on a recommandé plusieurs formules pour la préparation de ces milieux.

Sérum de Bumm. — Bumm utilise le sérum de sang humain solidifié : pour le préparer, il recueille purement du sang pendant l'accouchement ; aussitôt après la section du cordon, on lave au sublimé l'extrémité placentaire de celui-ci, le placenta restant dans l'utérus ; puis on dispose sous cette extrémité l'orifice d'un ballon flambé et on y recueille le sang qui s'écoule. On peut ainsi obtenir jusqu'à 100 centimètres cubes de sang ; ce sang abandonne au bout de dix-huit à vingt-quatre heures un sérum parfaitement clair, qui est solidifié par le procédé ordinaire.

Il est plus aisé d'utiliser du sang aspiré dans une veine de l'avant-bras (Voy. p. 190). Les caractères de la culture sur sérum humain sont les mêmes que ceux de la culture sur gélose de Wertheim.

Gélose de Wertheim. — Liquéfier par la chaleur des tubes de gélose stérilisée (environ 6 centimètres cubes de gélose par tube) ; faire refroidir à + 45° et ajouter purement au contenu de chaque tube environ 4 centimètres cubes de sérum humain ou de liquide d'ascite stérile (environ 1/2 ou 1/3 du volume de la gélose). Mélanger par agitation, puis incliner le tube et le laisser refroidir ; après solidification, le milieu est prêt pour l'ensemencement.

Strie. — A 37° les ensemencements en strie donnent au bout de deux à trois jours une bandelette étroite, mince, grisâtre, demi-transparente, à surface humide et brillante.

Colonies isolées. — On peut couler la gélose de Wertheim dans des boîtes de Petri, l'y laisser solidifier, puis pratiquer à la surface des ensemencements en strie sans recharger l'öse (p. 88). A 37°, dès la vingt-quatrième heure, apparaissent de petites colonies punctiformes, transparentes ; les colonies s'étendent ensuite et vers le deuxième ou quatrième jour, elles ont la dimension d'une tête d'épingle, leurs bords sont légèrement sinueux (examen à la loupe), leur surface est hémisphérique et leur centre devient blanchâtre, semi-opaque.

Gélose de Kral. — Kral remplace dans la gélose de Wertheim le sérum humain par le sérum de veau et obtient un développement analogue à celui que nous avons décrit.

Gélose de Pfeiffer. — Ghon et Schlagenhaufer remplacent la gélose de Wertheim par le milieu de Pfeiffer, aisé à préparer : sur des plaques de gélose, on étend quelques gouttes de sang humain pur et frais. Les caractères de la culture sont les mêmes que ceux décrits plus haut.

Gélose de Steinschneider. — Steinschneider obtient un milieu favorable en mélangeant une partie d'urine recueillie purement et deux parties de gélose stérilisée (opérer comme pour la gélose de Wertheim).

Gélose ordinaire. — En ensemençant en strie une certaine quantité de pus blennorragique sur de la gélose ordinaire, on obtient un développement très grêle ; le microbe emprunte au pus lui-même les matériaux albuminoïdes qui lui sont nécessaires ; on obtient ainsi une couche vernissée très mince. La culture a peu de vitalité ; les passages successifs sur gélose sont impossibles, le développement ne se produisant plus dès le deuxième passage.

Pomme de terre. — Le gonocoque ne se développe pas sur la pomme de terre.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Le pus blennorragique est stérilisé en quelques minutes par une exposition à la température de + 55° ; de même le séjour pendant quelques heures à la glacière à 0° arrête définitivement le développement des cultures.

L'exposition à l'air et la dessiccation stérilisent rapidement le pus à gonocoque.

Les cultures présentent une vitalité très faible ; le microbe y meurt en deux ou trois semaines ; les ensemencements en série deviennent rapidement infertiles; en général, les tubes restent stériles après quatre à cinq passages.

CHAPITRE VI

LE BACILLE DU PUS BLEU

L'agent des suppurations bleues a été découvert par Gessard.

Les suppurations bleues, très fréquentes avant l'antisepsie, sont lus rares aujourd'hui ; toujours le bacille pyocyanique se trouve ssocié dans le pus bleu aux microbes ordinaires de la suppuration ; a présence constitue simplement une complication des plaies, comlication d'ailleurs peu grave.

Le bacille pyocyanique est capable d'envahir l'organisme humain uand une maladie préexistante lui ouvre une porte d'entrée ; c'est insi qu'on l'a rencontré dans les organes d'un homme atteint de èvre typhoïde ; Calmette l'a trouvé dans le sang de sujets atteints e dysenterie chronique ; on connaît une dizaine d'observations 'infections généralisées à bacille pyocyanique (Ehlens, Neumann, Ettinger, Schimmelsbuch).

On trouve quelquefois le bacille pyocyanique dans le sol, les eaux; esson a signalé sa présence presque constante dans les eaux de la réence de Tunis, régions où les suppurations bleues sont très fréquentes.

MALADIE PYOCYANIQUE EXPÉRIMENTALE.

Le cobaye, le rat, la souris et le lapin sont très réceptifs vis-à-vis u bacille de Gessard.

Le cobaye, le rat, la souris succombent à l'inoculation sous-cutanée e petites doses de cultures en bouillon. Le lapin est plus résistant ; ne succombe pas d'ordinaire après l'inoculation sous-cutanée; inoculation sous-péritonéale donne des résultats inconstants, mais injection intra-veineuse de 1 centimètre cube amène la mort en 4-48 heures. Les inoculations en série chez le lapin exaltent la virunce du microbe, si bien qu'après quelques passages on obtient un

bacille tuant rapidement à la dose de 0cc,1 de culture en bouillon.

Quand on injecte à un lapin 1 centimètre cube de culture en bouillon dans la veine de l'oreille, l'animal fait une maladie aiguë, il présente de la fièvre, de l'albuminurie, de la diarrhée; les microbes sont peu abondants dans le sang, mais très nombreux dans les reins.

L'inoculation de doses plus faibles de culture confère au lapin une maladie chronique caractérisée par l'amaigrissement et l'apparition de paralysies des membres, accompagnées de contractures. L'animal peut guérir; quand la mort survient il n'est pas rare de trouver à l'autopsie une véritable néphrite avec petit rein contracté et même de l'hypertrophie du ventricule gauche du cœur.

Dans certains cas, on trouve une dégénérescence amyloïde des reins, des infarctus des muqueuses digestives (Charrin).

L'inoculation sous-cutanée chez le cobaye produit une tuméfaction locale suivie d'une ulcération, puis le bacille se généralise et la mort survient.

Un bacille que nous avons isolé dans une eau tuait le rat blanc en 20-36 heures à la dose de un cinquième de centimètre cube inoculé sous la peau ; à l'autopsie, les organes abdominaux étaient fortement congestionnés, le péritoine contenait un peu de sérosité à peine louche et l'intestin présentait de nombreuses plaques de Peyer en voie d'ulcération ; deux fois les animaux ont eu des hématuries ; le bacille existait dans le sang, le foie, la rate, les reins, le liquide péritonéal, le contenu intestinal, etc. ; chez les deux rats ayant présenté des hématuries, le bacille existait dans l'urine recueillie dans la vessie.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le bacille pyocyanique se présente sous la forme d'un petit bâtonnet mince, de longueur assez variable, mobile et à extrémités arrondies ; sa longueur moyenne est de 1 μ, 5 environ, sa largeur de 5 à 6 μ.

Coloration. — Le bacille pyocyanique se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline ; il prend le Gram.

Variations morphologiques. — L'aspect du bacille pyocyanique est susceptible de se modifier considérablement quand on ensemence le microbe dans des milieux additionnés de faibles doses de substances antiseptiques (Guignard et Charrin) ; c'est ainsi que dans du bouillon contenant 0,02 p. 100 d'acide phénique, le bacille prend une forme

longue, filamenteuse ; l'addition d'alcool, de bichromate de potasse agit de même ; dans le bouillon additionné d'acide borique, le ba-



Fig. 141. — Forme normale dans le bouillon de bœuf.



Fig. 142. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,02 p. 10 de naphtol, après quarante-huit heures.

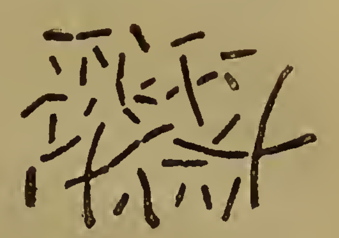


Fig. 143. — Culture dans du bouillon additionné de 4 p. 100 d'alcool, après vingt-quatre heures.

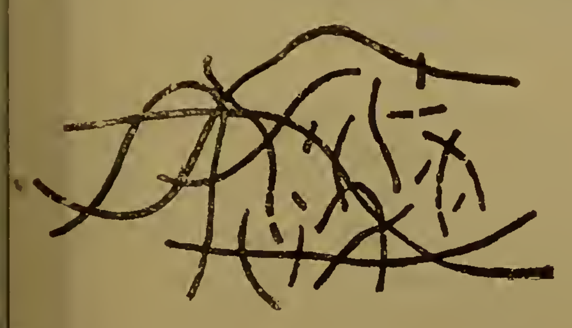


Fig. 144. — Culture dans du bouillon additionné de bichromate de potasse à 0gr,015 p. 100, après quinze heures.



Fig. 145. — Culture dans du bouillon additionné de 0gr,06 p. 100 d'acide borique après quarante-huit heures.

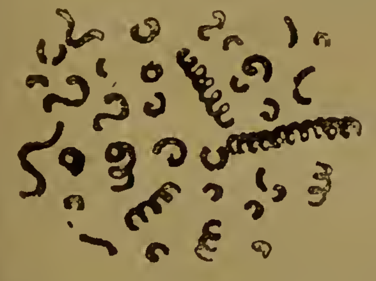


Fig. 146. — Culture dans du bouillon additionné de 0,70 p. 100 d'acide borique, après six jours.

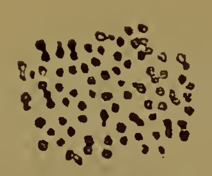


Fig. 147. — Culture âgée de quelques semaines dans du bouillon additionné de 0gr,10 p. 100 de créosote.

Fig. 141 à 147. — Formes diverses que prend le *Bacille du pus bleu* dans les cultures auxquelles on ajoute des antiseptiques (D'après Guignard et Charrin).

cille prend une forme spirillaire ; dans un milieu créosoté, il se développe sous forme de coccus.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille de Gessard est facultativement anaérobie, mais il ne fabrique de la matière colorante qu'au contact

de l'air. Il cultive entre 15 et 43c ; la température optima est comprise entre 35 et 37c.

Bouillon. — A 37c, trouble dès la huitième heure, puis apparition d'une teinte verdâtre fluorescente ; les jours suivants il se forme un voile blanc ridé à la surface du bouillon ; ce voile épaissit, devient sec, brunâtre et tombe au fond du tube où il se forme un dépôt blanc sale ; le bouillon prend une teinte vert foncé, puis brunâtre. La culture est visqueuse, filante et répand une odeur caractéristique.

Gélatine. — *Piqûre.* — Dès le deuxième jour, à 20c, il se forme de petites colonies le long de la piqûre ; ces colonies confluent, donnent une strie blanche et vers le troisième jour apparaît une cupule de liquéfaction (*liquéfaction en verre à champagne*) ; la liquéfaction s'étend rapidement jusqu'aux parois du tube ; le milieu se colore en vert.

Colonies isolées. — Dès le deuxième jour apparaissent sur les plaques de petites colonies jaunâtres, granuleuses ; ces colonies liquéfient rapidement autour d'elles, et la liquéfaction envahit la totalité de la plaque. La gélatine prend une teinte verte.

Gélose. — Dès le premier jour à 37c, apparition d'une strie verdâtre qui envahit rapidement la surface de la gélose ; la gélose prend une teinte verte fluorescente.

Pomme de terre. — Le long de la strie d'inoculation, se développe un enduit épais, coloré en brun ; si on racle cet enduit, la partie de la pomme de terre sous-jacente verdit au contact de l'air.

RECHERCHE.

La présence du bacille pyocyanique dans le pus est signalée par la teinte bleuâtre que prennent les linges de pansement et par l'odeur caractéristique que répandent les plaies.

Dans le pus, on cherchera le bacille au moyen de l'examen microscopique de lamelles colorées au violet de gentiane ou à la thionine ; de plus, on fera des isolements sur plaques de gélatine avec un peu de pus ; les colonies du bacille de Gessard se reconnaîtront facilement à leur aspect.

Dans l'eau, Besson a isolé facilement le bacille pyocyanique en ensemençant une certaine quantité d'eau dans le milieu gélo-peptosel de Metchnikoff ; dès qu'un voile s'est formé (douzième-quinzième heure), on fait un second passage. Une trace du deuxième voile sert à ensemencer des plaques de gélatine où l'on isole facilement le microbe.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES. — PRODUITS FORMÉS DANS LES CULTURES.

Pigments (Gessard). — Quand on agite une culture en bouillon avec du chloroforme et qu'on abandonne un instant le tube au repos, il se forme à la partie inférieure une couche chloroformique teintée en bleu pur, tandis qu'il surnage un liquide aqueux d'un beau vert fluorescent.

Le bacille pyocyanique sécrète en effet deux pigments, l'un bleu, la *pyocyanine;* l'autre vert fluorescent. Au contact de l'air, la pyocyanine s'oxyde et donne une matière brune, la *pyoxanthose.*

On peut faire varier à volonté la production de la pyocyanine et de la matière verte en ensemençant le bacille sur différents milieux de culture.

Nous venons de dire qu'en bouillon le bacille sécrète de la pyocyanine et de la matière verte. Dans une solution de peptone, Gessard a vu le bacille se développer sans produire de matière verte, la culture avait une belle teinte bleue; ce phénomène ne se produit pas avec toutes les peptones; de même, sur gélose peptoglycérinée, la production de pyocyanine est considérablement accrue; la pyocyanine se produit seule dans une solution de gélatine à 10 p. 100 additionnée d'un peu de glycérine et maintenue à 35^c.

Au contraire, dans un milieu contenant 2 p. 100 de glucose, la matière verte se produit seule; il en est de même sur l'albumine de l'œuf. L'addition au bouillon de 5 à 6 p. 100 de glucose fait cesser la production de matière colorante.

Gessard est arrivé à créer des bacilles donnant les uns de la matière verte, les autres de la pyocyanine. Wasserzug en cultivant le bacille sur des milieux légèrement acides lui a fait perdre, d'une façon définitive, la propriété de fabriquer des pigments; Charrin est arrivé au même résultat par des cultures en série dans du bouillon à 42^c.

La pyocyanine s'obtient facilement en épuisant par le chloroforme une culture en bouillon ou sur gélose; dans le dernier cas, il suffit de laisser le chloroforme en contact avec la culture pendant quelques heures sans agitation. Le chloroforme prend une teinte bleue et par évaporation abandonne la pyocyanine sous forme de longues aiguilles bleues. Les solutions de pyocyanine sont virées au rouge par les acides faibles et se recolorent en bleu sous l'influence des alcalis. Les cultures en bouillon et en solution de peptone filtrées sur la bougie

Chamberland gardent leur coloration. La pyocyanine n'est pas toxique.

Toxines. — Les cultures filtrées de bacille pyocyanique injectées au lapin amènent rapidement la mort de cet animal ou produisent une cachexie accompagnée de paralysie et pouvant se terminer par la mort.

La toxicité des cultures n'est pas due à la pyocyanine; les cultures contiennent deux poisons différents : l'un, le plus actif, précipitable par l'alcool; l'autre, soluble dans l'alcool.

L'injection de petites doses de cultures filtrées ou chauffées à 115° permet d'obtenir l'immunisation du lapin; après les injections, la substance active des cultures s'élimine par les reins, et l'urine se montre douée de propriétés immunisantes.

Pour Bouchard, Charrin et Arnaud, il y a lieu de distinguer entièrement les substances toxiques des substances immunisantes; le sérum des animaux vaccinés n'est pas bactéricide, mais Charrin et Roger ont constaté qu'il produit sur les cultures du bacille de Gessard le phénomène de l'agglutination.

Antagonisme avec le charbon. — Dans les cultures le bacille pyocyanique empèche le développement du charbon; de même, quand on injecte aux animaux réceptifs au charbon un mélange de bactéridie et de bacille de Gessard, ils ne prennent pas le charbon : bien plus, les cultures pyocyaniques débarrassées des microbes par la filtration sur la porcelaine possèdent les mêmes propriétés empêchantes.

Le bacille pyocyanique possède des propriétés empêchantes analogues vis-à-vis du vibrion du choléra.

CHAPITRE VII

LE BACILLE DU CHANCRE MOU

Le bacille du chancre mou, découvert par Ducrey, a été étudié par Unna et par Nicolle.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

C'est un gros bacille, peu allongé, mesurant 0,50 μ de largeur sur 1,50 à 2 μ de longueur; ses extrémités sont arrondies; il présente parfois deux encoches latérales qui lui donnent l'aspect d'un 8. Il se rencontre dans le pus, isolé, ou en chainettes de 3-5 et même 10-20 éléments; les amas peuvent être constitués par des chainettes serrées les unes contre les autres. Les bacilles sont d'ordinaire libres, mais il n'est pas rare de les rencontrer à l'intérieur des leucocytes polynucléaires.



Fig. 148. — Bacille du chancre mou. — Coloration par la méthode de Nicolle.

Coloration. — Le bacille de Ducrey se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline en solutions mordancées; il se décolore par le Gram.

CULTURES.

Le bacille de Ducrey n'a pu encore être cultivé.

RECHERCHE.

1° **Dans le pus chancreux.** — Racler la surface de l'ulcération, étaler le pus sur des lamelles, en ayant soin de ne pas écraser la préparation pour éviter de dissocier les chaînettes. — Sécher, — Fixer.

Colorer par la thionine, le violet ou le bleu phéniqué. Examiner dans l'eau ou dans le baume.

Tantôt les bacilles sont très abondants dans la préparation, tantôt, au contraire, ils sont rares ; il peut exister ou non des chaînettes.

2° **Dans les coupes.** — Fixer la pièce au sublimé acide (p. 205), durcir à l'alcool, monter à la paraffine.

Le procédé de choix pour la coloration est le procédé au tanin de Nicolle (p. 215). Colorer au bleu de Kühne, faire agir quelques secondes la solution de tanin à 1/10e, laver à l'eau, à l'alcool, à l'essence et au xylol. Monter au baume.

ASSOCIATIONS MICROBIENNES.

Le bacille de Ducrey ne se rencontre pas à l'état pur dans le pus chancreux ; les associations les plus fréquentes sont les staphylocoques, un bacille banal (Bacillus cutis commune de Nicolle) et le gonocoque.

CHAPITRE VIII

LE BACILLE DE LA POURRITURE D'HOPITAL

L'agent de la pourriture d'hôpital a été récemment découvert et décrit par Vincent.

C'est un bacille mesurant 4 à 8 μ de long sur 1 μ environ d'épaisseur ; on le trouve en abondance dans la pulpe pseudo-membraneuse qui existe à la surface des plaies. La présence de ce bacille est constante dans les lésions de la pourriture d'hôpital.

RECHERCHE ET CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Des frottis préparés avec la pulpe pseudo-membraneuse sont colorés avec la fuchsine de Ziehl, la thionine ou le violet phéniqué. Sur les préparations ainsi obtenues, on voit de nombreux bacilles souvent rectilignes, quelquefois légèrement incurvés et même en forme d'S allongé ; l'aspect de ces bacilles se rapproche de celui du vibrion septique avec cette différence que leurs extrémités ne sont pas nettement carrées, mais amincies ou arrondies. Beaucoup de bacilles sont articulés par deux. Le nombre des bacilles dans les préparations est en rapport avec la gravité des cas : dans les cas bénins, on en trouve 20 à 30 par préparation, et un nombre considérable, une véritable culture pure, dans les cas graves.

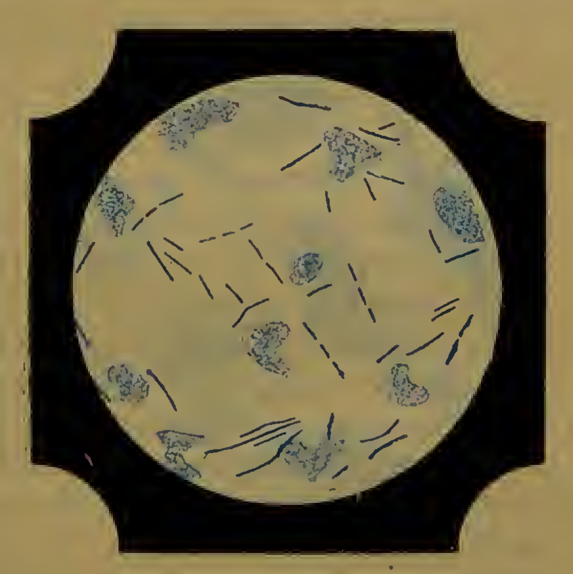


Fig. 149. — Bacille de la pourriture d'hôpital (D'après Vincent).

Dans des parcelles de pulpe fraîche examinées dans une goutte de bouillon ou d'eau stérile, le bacille paraît immobile.

Coloration. — Le bacille de la pourriture d'hôpital se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline, mais il ne prend pas le Gram.

Les bacilles colorés par le bleu de méthylène prennent inégalement la matière colorante et présentent des vacuoles inégales non arrondies qui ne sont évidemment pas des spores et ne se colorent pas par les procédés de coloration des spores.

Dans les plaies traitées par les antiseptiques, on note de nombreuses formes d'involution : bacilles vacuolaires à bouts terminés en fuseau ou à bords échancrés, formes longues à étranglements bien colorés et à renflements incolores.

Le bacille de la pourriture d'hôpital reste toujours localisé ; il n'envahit jamais l'organisme ; on ne le trouve jamais dans le sang ni dans les ganglions.

Coupes. — Des fragments de tissus prélevés dans les foyers pathologiques sont fixés dans la solution aqueuse saturée de sublimé, puis durcis dans de l'alcool progressivement renforcé. Les coupes sont colorées de préférence à la thionine ; Vincent recommande le procédé suivant :

1° Colorer la coupe pendant dix minutes dans la thionine phéniquée.

2° Faire agir pendant quelques secondes la solution suivante :

Alcool absolu................................	200 centimètres cubes.
Iode..	0gr,01

3° Remplacer la solution iodée par de l'alcool absolu ordinaire ou teinté par la safranine ou la fluorescéine.

4° Éclaircir par l'huile d'aniline, laver au toluène.

5° Monter dans le baume.

Sur les coupes ainsi préparées, on constate deux couches :

1° Une couche superficielle, épaisse de 1 à 3 millimètres, teintée en gris bleuâtre, constituée par l'exsudat diphtéroïde, remarquablement pauvre en éléments cellulaires dans sa partie superficielle, mais constituée par une sorte de buisson compact de bacilles à sa partie profonde.

2° Une couche constituée par les tissus mortifiés, infiltrés de sang et dans lesquels toute trace de structure a disparu sur une certaine épaisseur ; l'on remarque une agglomération de leucocytes au-dessous de la couche microbienne.

ASSOCIATIONS MICROBIENNES.

Dans les coupes et frottis, le bacille de Vincent se trouve le plus ouvent à l'état pur; quelquefois on voit quelques microcoques ou acilles, plus nombreux à la surface des lésions, mais l'association a plus fréquente (40 fois sur 47 cas examinés) est un spirille très fin, ifficile à colorer et non cultivable.

Les coccus et bacilles rencontrés par Vincent à côté du bacille pécifique appartiennent aux espèces suivantes : staphylococcus yogenes albus et aureus, streptococcus pyogenes, proteus vulgaris, acillus pyocyaneus, bacterium coli, et bacille de Friedländer.

CULTURES.

Le bacille de la pourriture d'hôpital n'a pu être cultivé par Vinent; Coyon, après Vincent, a également échoué dans ses essais de ulture.

Vincent a essayé les milieux les plus divers : milieux usuels, bouilon additionné de sérum, sang, sérum humain, infusion de foin, ulpe gangreneuse, milieux sur lesquels avaient poussé le streptoque et le staphylocoque. Les essais de culture ont eu lieu à l'air et l'abri de l'air.

INOCULATIONS.

Homme. — L'inoculation directe de l'homme à l'homme, tentée epuis longtemps par Willaume, Percy, Richerand, Dupuytren, etc., récemment par Vincent sur lui-même et sur des Arabes, a toujours choué à reproduire les lésions de la pourriture d'hôpital.

Animaux. — 1° Chez le *cobaye*, le *lapin*, le *rat blanc*, des plaies rtificielles couvertes de pulpe fraîche ont guéri rapidement sans résenter les caractères de la pourriture d'hôpital.

Des injections abondantes d'émulsions de fausses membranes, ous la peau, dans le péritoine, dans le sang, dans les muscles n'ont ntraîné aucun accident sérieux chez les mêmes animaux. Vincent a mplement observé quelques abcès dus aux microbes associés.

Même après la section du sciatique, la ligature de la fémorale, le roiement d'un membre, les inoculations ont échoué.

Cependant Coyon ayant pratiqué dans la cuisse d'un cobaye une laie profonde, anfractueuse, avec dilacération musculaire, y ayant ntroduit de la sanie et des membranes de pourriture d'hôpital, puis uturé et collodionné la peau, obtint au bout de dix-huit jours une

plaie en entonnoir recouverte d'une couenne où fourmillait le bacille de Vincent.

2° Mais en se servant d'animaux dont l'organisme a été affaibli par une maladie microbienne ou en renforçant l'activité du bacille par une association microbienne, Vincent est arrivé à reproduire la pourriture d'hôpital.

Un *lapin tuberculeux* reçut sous la peau du flanc 1 centimètre cube d'émulsion de pulpe gangreneuse et présenta un petit abcès, puis une plaie ulcéreuse couverte d'une membrane contenant le bacille.

A l'*état de jeûne*, les animaux sains ne se sont pas montrés réceptifs.

L'*association* au virus de quelques gouttes de culture de streptocoque, de staphylocoque pyogène, de bacterium coli, de bacille de Friedlander ou de bacille pyocyanique a permis de conférer la pourriture d'hôpital aux lapins : toujours, dans les lésions les germes favorisants tendent à disparaître et le bacille spécifique se retrouve à peu près à l'état pur ; le plus souvent, les microbes favorisants se trouvent à la surface des lésions et les bacilles de Vincent prédominent à la profondeur de l'exsudat membraneux. Les inoculations en série ne réussissent pas.

CHAPITRE IX

LE PNEUMOCOQUE

Le pneumocoque est l'agent de la pneumonie lobaire (Talamon, Fränkel), mais là ne se borne pas son rôle étiologique : il cause la plus grande partie des complications de la pneumonie et un certain nombre d'autres affections.

I. — Le pneumocoque se rencontre fréquemment dans la *salive* des personnes saines (Pasteur, Sternberg, Fränkel) ; Netter l'a rencontré 4 fois sur 5 dans la salive des sujets ayant déjà eu une pneumonie et 1 fois sur 5 dans celle des personnes qui n'ont jamais été atteintes par cette affection. Chez les premiers, Netter a constaté que, pendant la pneumonie, le pneumocoque de la salive est virulent; cette virulence disparaît au moment de la crise pour se manifester de nouveau au bout d'une quinzaine de jours. Chez les sujets sains le pneumocoque vit en parasite inoffensif dans la cavité buccale ; mais, si la résistance de l'organisme vient à être affaiblie pour un motif quelconque, la bactérie triomphe de l'action protectrice des phagocytes et envahit le poumon.

II. — Dans la *pneumonie lobaire* on trouve toujours le pneumocoque dans le foyer d'hépatisation ; le microbe peut se rencontrer à l'état de pureté ou associé à d'autres bactéries, principalement le streptocoque pyogène, les staphylocoques et le bacille de Friedländer. On le retrouve dans les crachats rouillés.

III. — Le pneumocoque envahit quelquefois le *sang* et va causer au voisinage ou au loin des complications souvent suppuratives (Friedländer, Talamon, Fränkel). Le *pus* à pneumocoques est épais, visqueux, très riche en éléments cellulaires et présente une coloration verdâtre; ces suppurations ont une tendance naturelle à la guérison.

IV. — Les *pleurésies* et *péricardites* fibrineuses ou purulentes, les *endocardites* végétante ou ulcéreuse, la *méningite*, la *néphrite*, la *parotidite* suppurée, les *arthrites* suppurées, la *péritonite*, la *métrite*,

des *abcès* à pneumocoque peuvent apparaître comme complications de la pneumonie; mais il faut savoir que ces complications peuvent également être causées par les différents microbes de la suppuration.

V. — En dehors de ces cas où coexiste une pneumonie, le microbe de Talamon-Fränkel peut déterminer, primitivement, des *pleurésies* fibrino-purulentes, des *péricardites* séro-fibrineuses ou suppurées (Osler, Banti), des *otites suppurées* (Zanfal, Netter), des *endocardites ulcéreuses* (Jaccoud et Netter, Weichselbaum), des *angines* simples ou membraneuses (Cornil, Jaccoud, Ménétrier, Rendu et Boulloche), des *péritonites*, des *suppurations des voies biliaires*, enfin des *méningites*. Netter a trouvé le pneumocoque 18 fois sur 31 cas de méningite non accompagnés ou suivis de pneumonie. On a attribué au pneumocoque la *méningite cérébro-spinale épidémique* (Foa, Landouzy), il semble cependant que l'agent de cette affection est un microbe voisin du pneumocoque, décrit par Weichelsbaum sous le nom de diplocoque intra-cellulaire.

VI. — On peut rencontrer le pneumocoque comme microbe associé dans les *angines diphtéritiques*.

VII. — Certaines *broncho-pneumonies* enfin relèvent du pneumocoque.

PNEUMOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

La souris est l'animal le plus sensible au pneumocoque; viennent ensuite le lapin, puis, par ordre de sensibilité décroissante, le rat, le mouton, le cobaye et le chien. Le pigeon est réfractaire.

Souris. — L'inoculation sous la peau, de petites quantités de cultures ou des différents exsudats pneumococciques cause invariablement la mort de la souris en douze à trente heures. La souris succombe à une septicémie à pneumocoques sans présenter d'altérations pulmonaires ; au point d'inoculation les lésions sont insignifiantes et se bornent à un peu d'œdème. A l'autopsie les lésions sont minimes: on ne constate guère que de l'hypertrophie de la rate ; le sang est noir, et contient, ainsi que la rate, les autres viscères, le péritoine et la moelle osseuse, une grande quantité de pneumocoques encapsulés.

Lapin. — Deux cas peuvent se présenter :

a). *Inoculation d'un pneumocoque actif.* — L'inoculation sous-cutanée, péritonéale ou intra-veineuse, produit une septicémie qui entraîne la mort en vingt-quatre à soixante-douze heures; on constate peu de réaction locale, de l'hypertrophie de la rate, et la présence du pneumocoque dans le sang et les viscères.

Quand l'inoculation a été pratiquée dans le poumon, on observe en nème temps une pneumonie lobaire et souvent une pleurésie du nème côté.

b). *Inoculation d'un pneumocoque atténué.* — L'inoculation sous-utanée entraîne la mort beaucoup moins rapidement que dans le as précédent ; on constate une réaction inflammatoire au lieu de 'inoculation; l'animal succombe non plus à une septicémie sans ocalisations viscérales, mais à une véritable pneumonie lobaire dentique à celle de l'homme, et s'accompagnant fréquemment de leurésie, de péricardite, de péritonite, etc...

Rat. — Le rat ne succombe qu'à la condition de recevoir des doses e virus beaucoup plus fortes que celles qui sont nécessaires pour uer la souris et le lapin. Au point d'inoculation il se produit une éaction inflammatoire intense : l'œdème séro-fibrineux peut s'étendre toute la paroi de l'abdomen et du thorax : il se produit fréquemment une pneumonie lobaire et, à l'autopsie, on trouve peu de neumocoques dans le sang.

L'inoculation dans le poumon produit un noyau de pneumonie obaire accompagné de pleurésie séro-fibrineuse.

Mouton. — Le mouton ne succombe guère qu'à l'inoculation sous-utanée de doses de cultures supérieures à un centimètre cube. 'inoculation entraîne une infiltration œdémateuse très étendue utour du point d'entrée de l'aiguille ; quand la mort survient on rouve peu de microbes dans le sang.

L'inoculation intra-pulmonaire provoque une pneumonie mortelle.

L'inoculation intra-trachéale semble inoffensive, cependant amaleia a réussi à provoquer par ce moyen une pneumonie nortelle, à la condition d'irriter au préalable les voies respiratoires n y injectant une solution de tartre stibié.

La vitalité et la virulence du pneumocoque s'atténuent considérablement par le passage chez le mouton et les inoculations en série ont impossibles.

Cobaye. — Le cobaye est très résistant ; après inoculation il présente une réaction locale plus ou moins marquée et guérit le plus ouvent.

Chien. — Le chien ne succombe qu'à des doses massives ; après 'inoculation sous-cutanée il se produit un œdème très étendu et la nort survient quelquefois vers le quatrième ou cinquième jour ; le ang renferme de rares pneumocoques.

L'inoculation intra-pulmonaire produit une pneumonie qui évolue omme celle de l'homme et se termine, en règle, par la guérison.

L'inoculation intra-trachéale est d'ordinaire inoffensive, cependant

Tchistovich a réussi, par ce procédé, à tuer 3 chiens sur 19 inoculés. Dans la pratique de cette inoculation il faut observer scrupuleusement les précautions indiquées page 184, pour ne pas déposer de virus au sein des tissus avoisinant la trachée, ce qui fausserait les résultats.

En résumé, les animaux très réceptifs succombent d'ordinaire à la septicémie pneumococcique; la pneumonie se manifeste de préférence chez les animaux moins réceptifs. Ici, comme toujours, la gravité de la septicémie est en raison inverse de l'importance de la lésion locale.

RECHERCHE DU PNEUMOCOQUE DANS LES EXSUDATS ET LES ORGANES.

Homme. — A. — *Pendant la vie* le pneumocoque sera recherché :

a). **Dans les crachats.** — Recueillir les crachats avec les précautions ordinaires (p. 189); avec une forte öse prélever une parcelle au centre d'un crachat rouillé.

1° En faire des *frottis*, pour l'examen microscopique (Voy. plus loin les procédés de coloration).

2° Il est inutile de pratiquer directement des *ensemencements* : les impuretés gêneraient le développement du pneumocoque dans les cultures.

3° *Inoculer*, avec un peu de crachats broyés dans de l'eau stérile. une souris à la base de la queue; si l'on se trouve bien en présence du pneumocoque l'animal succombe rapidement; à l'autopsie, prélever purement du sang du cœur ou de la moelle osseuse et ensemencer avec ces substances des tubes de gélose et de bouillon qui seront placés à l'étuve à 37°.

Pour établir le diagnostic, l'inoculation doit toujours être faite à la souris et non au lapin; ce dernier animal est beaucoup moins sensible que la souris et certains crachats contiennent un pneumocoque à peu près inoffensif pour le lapin et très virulent pour la souris (Gamaleia).

b). **Dans le suc pneumonique.** — On se procure le suc pneumonique, en pratiquant une ponction dans le foyer hépatisé (Voy p. 195); on recherche les pneumocoques dans ce suc par l'examen microscopique et les inoculations; on a des chances d'obtenir par la ponction du poumon une sérosité ne contenant que du pneumocoque en culture pure et on peut pratiquer directement des ensemencements sur gélose.

c). **Dans le pus, les exsudats.** — Même technique que pour le suc du poumon.

d). **Dans le sang.** — Le pneumocoque ne se rencontre pas d'une manière constante dans le sang des pneumoniques (Foa, Talamon, Klemperer). On le recherchera de préférence vers le cinquième ou sixième jour, surtout dans les cas graves. Quand l'affection doit entraîner la mort, on trouve ordinairement le pneumocoque dans le sang pendant les derniers jours ou les dernières heures ; mais la constatation de la présence du pneumocoque dans la circulation générale n'implique pas forcément un pronostic fatal.

On recherche le pneumocoque dans le sang par l'*examen microscopique*, les *cultures* et l'*inoculation* à la souris. On prélève le sang nécessaire à ces recherches soit par piqûre du doigt, soit dans une veine du pli du coude (Voy. *Technique générale*).

B. — *A l'autopsie.* (Pour fournir des résultats satisfaisants, l'autopsie doit être pratiquée le plus tôt possible après la mort.) On recherchera le pneumocoque :

a). **Dans le suc pulmonaire.** — Cautériser la surface du bloc hépatisé ; y pénétrer avec une pipette Pasteur et aspirer du suc qui servira à préparer des lamelles, à pratiquer des ensemencements, des inoculations.

b). **Dans les coupes du poumon.** — De petits fragments de poumon hépatisé sont immédiatement fixés à l'alcool ou au sublimé acide; ils seront ensuite inclus dans la paraffine, coupés et colorés par les méthodes indiquées plus bas.

c). **Dans le pus et les exsudats.** — Recueillir selon les règles données au chapitre XI ; préparer des frottis, ensemencer et inoculer.

Animaux. — Le pneumocoque sera recherché dans le sang, la moelle osseuse, les sérosités pleurale, péritonéale, péricardique, les pulpes de viscères, les coupes d'organes, etc.

Des lamelles de sang, des frottis seront soumis à l'examen microscopique. Les ensemencements pratiqués avec le sang, la moelle osseuse, les exsudats recueillis aseptiquement, donnent des cultures pures qui seront utilisées pour de nouvelles inoculations.

Les organes à couper seront durcis à l'alcool absolu et inclus à la paraffine.

MORPHOLOGIE DU PNEUMOCOQUE.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'aspect du pneumocoque diffère selon que le microbe provient de l'organisme de l'homme ou des animaux ou des cultures en milieux

artificiels. Dans les cultures en milieux liquides albumineux (sérum, bouillon additionné de sang frais, etc.), le pneumocoque a les mêmes caractères que dans l'organisme.

A. Aspect du pneumocoque dans l'organisme. — Le pneumocoque, dans les crachats, le sang, les pulpes d'organes, etc., se présente sous la forme de coccus, quelquefois arrondis, ordinairement ovalaires et légèrement effilés à leurs extrémités, ayant, en un mot, l'apparence d'un grain d'orge, d'une lancette, ou d'une flamme de bougie. Ces grains sont d'ordinaire réunis par deux, en diplocoques; les deux éléments d'un diplocoque se regardent par une de leurs extrémités pointues ; on trouve çà et là quelques grains isolés et aussi de courtes chaînettes formées par 3 ou 4 coccus. Les coccus isolés, les diplocoques et les chaînettes sont entourés d'une *capsule* ou auréole, sorte de gangue albumineuse qu'il est possible de colorer.



Fig. 150. — Pneumocoque (exsudat péritonéal du lapin). — Thionine phéniquée (Reich.; Obj. 1/12 imm.; Oc. III).

La taille du pneumocoque est assez variable; les plus petits éléments mesurent 0,50 sur 0μ,75, les plus grandes 1 μ sur 1μ,25 ; les grains arrondis ont, en général, de 0,50 à 0μ,75 de diamètre.

Coloration. — Le pneumocoque se colore facilement par les couleurs d'aniline et prend le Gram ; on le recherchera de préférence par les procédés suivants :

a). *Procédé recommandé* (Nicolle). — Colorer le frottis, préparé selon les règles ordinaires, en le laissant au contact pendant cinq à six secondes avec le krystalviolet phéniqué : passer rapidement à l'alcool acétone au 1/3 ; laver, sécher, monter.

b). *Méthode de Gram.* — Doit toujours être employée pour le diagnostic. Elle permet d'obtenir de très belles préparations avec les lamelles de sang. Opérer suivant le procédé recommandé page 212 pour la double coloration. Les capsules restent incolores.

c). *Coloration des capsules.* — Un certain nombre de procédés permettent de colorer les capsules ; les capsules restent toujours plus claires que les grains qui y sont contenus. Le procédé *a* teinte légè-

rement les capsules, on obtiendrait une coloration plus nette par la méthode suivante :

Colorer le frottis pendant une ou deux minutes avec le liquide de Ziehl; laver, traiter rapidement par de l'eau additionnée de 1 p. 100 d'acide acétique; laver, sécher, monter dans le baume.

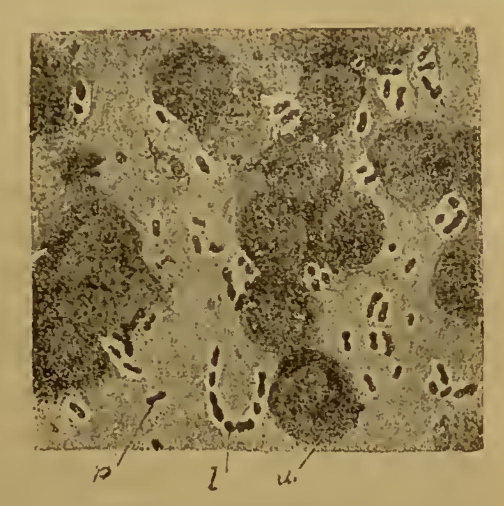


Fig. 151. — Pneumocoques dans la salive (D'après Biondi).

d). *Coloration des coupes.* — I. — Les coupes seront soumises de préférence à la double ou à la triple coloration selon la méthode de Gram (procédés recommandés p. 223); on obtiendra ainsi des préparations très démonstratives. On pourrait encore utiliser le procédé de Weigert (p. 221).

II. — La coloration des capsules dans les coupes présente quelque difficulté, on l'obtiendra par le procédé de Friedländer :

1° Plonger la coupe pendant vingt-quatre heures dans la solution suivante :

Fuchsine	1	gramme.
Alcool absolu	5	grammes.
Acide acétique	2	—
Eau distillée	100	—

2° Au sortir du bain colorant la coupe est lavée à l'alcool, puis portée pendant deux minutes dans une solution d'acide acétique à 1 p. 100;

3° Laver à l'eau distillée ;

4° Déshydrater par l'alcool absolu ; éclaircir par l'essence de girofles et le xylol ;

5° Monter dans le baume.

B. **Aspect du pneumocoque dans les cultures.** — Dans les cultures en milieux artificiels le pneumocoque *n'est pas encapsulé;* on ne retrouve des capsules que dans les cultures en sérum liquide ou en sang.

Dans les cultures le pneumocoque garde sa forme caractéristique, lancéolée ; on trouve aussi de nombreux grains arrondis qui se rencontrent parfois à l'exclusion des formes lancéolées. Les grains sont isolés, associés en diplocoques ou en chaînettes courtes de 3-8 éléments ; ces chaînettes abondent surtout dans les cultures en milieux

liquides où elles sont quelquefois plus longues et flexueuses; dans les chaînettes les grains ont leur grand diamètre allongé suivant l'axe de la chaînette.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le pneumocoque est un aérobie facultatif. Il ne se développe pas au-dessous de $+24^c$, ainsi ne peut-on le cultiver sur la gélatine ordinaire. Son développement s'arrête à $+42^c$; la température optima de culture est aux environs de 35^c-37^c. Son développement est plus actif dans les milieux liquides que sur les milieux solides et exige une légère alcalinité du milieu.

Gélose. — Après vingt-quatre heures à 37^c, il se développe sur la gélose un fin semis de petites colonies transparentes, difficiles à voir, jamais confluentes, ressemblant à des gouttes de rosée.

Sérum coagulé. — Mêmes colonies que sur la gélose; quelquefois les colonies se réunissent et forment un mince voile semi-transparent.

Bouillon. — A 37^c, très léger trouble au bout de vingt-quatre à trente-six heures, puis précipitation d'un dépôt minime, pulvérulent.

Bouillon additionné de sang de lapin. — Pour préparer le milieu, recueillir aseptiquement du sang dans la veine auriculaire du lapin (p. 191) et ajouter ce sang à du bouillon stérilisé, dans la proportion d'un quart à un tiers. Dans ce milieu, à 37^c, le pneumocoque cultive abondamment; il se produit un trouble notable, puis il se forme un précipité muqueux, louche, très riche en microbes.

Sérum liquide. — Le sérum qui convient le mieux pour cultiver le pneumocoque est celui que l'on prépare avec du sang de lapin, recueilli aseptiquement et non chauffé. Dans le sérum à 37^c, on obtient une culture très abondante; il se produit d'abord une augmentation de consistance du milieu en même temps qu'un trouble notable, puis il se forme un précipité abondant constitué par des pneumocoques capsulés.

Lait. — Le pneumocoque cultive dans le lait en le coagulant.

Pomme de terre. — Le pneumocoque ne se développe pas sur la pomme de terre.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Virulence et vitalité. — Dans les cultures le pneumocoque perd rapidement sa virulence et même sa vitalité. Les cultures sur gélose et sur sérum solidifié meurent au bout de quatre à cinq jours; dans les cultures en milieux liquides la vitalité persiste plus long-

emps, mais la virulence disparaît vers le septième jour. L'atténuation se produit d'autant plus vite que le milieu convient moins au neumocoque ; elle est plus tardive dans les cultures en bouillon dditionné de sang que dans le bouillon ordinaire.

La virulence s'affaiblit rapidement dans les cultures successives : lle disparaît dès la troisième culture.

Pasteur a montré que l'atténuation des cultures était due à l'action le l'oxygène de l'air ; cette influence nocive s'exerce d'autant plus nergiquement que la température est plus élevée : à 42° les cultures n bouillon deviennent inactives en vingt-quatre heures. Il en ésulte que le pneumocoque conserve plus longtemps sa virulence ans les cultures anaérobies (Fraenkel) ; dans les cultures en œuf, ratiquées comme il est dit page 51 (A), il resterait actif pendant lusieurs mois (Bunzl-Federn).

Le procédé le plus efficace pour conserver du pneumocoque virunt, consiste à inoculer la culture à un lapin, puis à prélever à autopsie un peu de sang du cœur dans une pipette Pasteur à étranlement. La pipette pleine, on en scelle à la lampe l'effilure termiale et l'étranglement ; le sang ainsi conservé en tube clos (fig. 47) arde fort longtemps sa virulence ; pour l'utiliser on doit commencer ar l'ensemencer en bouillon ; la culture âgée de vingt-quatre à rente-six heures servira à de nouvelles inoculations.

Une autre cause d'atténuation et de mort du pneumocoque résulte u développement rapide d'une acidité notable dans les cultures ; ette acidité est due en grande partie à de l'acide formique. L'addiion de carbonate de chaux aux milieux de culture (p. 32) produit a saturation de l'acide à mesure de sa formation et permet de conerver le pneumocoque vivant pendant plus d'un mois (Wurtz et losny).

Dans les crachats, le pneumocoque peut conserver longtemps sa italité et sa virulence et même résister à une dessiccation prolongée Bordoni) ; de même le pneumocoque semble capable de vivre assez ongtemps dans la terre, les poussières : Emmerich a trouvé un pneuocoque virulent dans les poussières de l'entrevous d'une salle où e trouvaient des pneumoniques, Uffelmann en aurait rencontré dans 'air d'une cave.

Restitution et exaltation de la virulence. — *a*). On peut restituer a virulence à un pneumocoque affaibli en injectant au lapin une uantité assez considérable (un centimètre cube de culture en bouilon) associée à une quantité égale de culture filtrée de *proteus vulgaris* : animal succombe à la septicémie pneumococcique et son sang conient le microbe virulent.

b). Les passages successifs par le lapin augmentent la virulence du pneumocoque ; l'inoculation intraveineuse convient mieux dans ce but que l'inoculation sous-cutanée, mais le procédé le plus sûr est celui d'Issaëff, par les inoculations intrapéritonéales : on injecte dans le péritoine d'un lapin A, 1 centimètre cube à $1^{cc},5$ du sang d'un lapin qui vient de succomber à la septicémie pneumococcique ; on fait un deuxième passage avec le sang du lapin A, et on continue la série jusqu'au huitième ou neuvième passage ; à partir de ce moment on diminue la dose de sang injectée dans le péritoine ; pour le onzième lapin, par exemple, il suffira d'inoculer 6 à 8 gouttes de virus. A partir du douzième passage environ le sang perd la propriété de se coaguler et devient extrêmement toxique et virulent ; les pneumocoques y abondent. Une goutte de ce sang introduite dans le péritoine d'un lapin suffit pour le tuer en dix ou douze heures ; si l'on augmentait la dose d'une manière trop considérable, si on injectait par exemple 1 à 2 centimètres cubes, le lapin succomberait très rapidement (cinq à six heures) à l'intoxication par les toxines contenues dans le sang, mais non à l'infection pneumococcique.

A la suite de l'injection sous-cutanée de IV à VI gouttes de sang à virulence exaltée, les lapins succombent en douze à quinze heures.

Au bout d'un grand nombre de passages par le péritoine du lapin, la virulence du pneumocoque s'affaiblit, mais il suffit de deux ou trois passages intrapéritonéaux chez des cobayes ou des chiens pour rétablir toute la force du virus.

TOXINES.

I. — Les cultures filtrées de pneumocoque sont peu actives et il faut en injecter de grandes quantités dans les veines du lapin pour obtenir des effets toxiques se traduisant par une élévation passagère de la température et une diminution de poids ; d'ordinaire la mort ne survient pas. On obtient des résultats un peu plus satisfaisants en tuant les microbes dans les cultures par le chloroforme ou par la chaleur (une température de 58^{c}, pendant deux heures, suffit pour détruire le pneumocoque sans altérer la toxine). Le sérum du sang de lapin est le milieu qui donne les cultures les plus toxiques.

Les cultures à l'abri de l'air, celles faites dans du bouillon ou du sérum maintenus alcalins n'ont aucun avantage au point de vue de la production de la toxine.

En précipitant les cultures en bouillon filtrées par l'alcool ou le

sulfate d'ammoniaque les frères Klemperer ont isolé une toxine; le fait a été confirmé par Foa et Carbone.

II. — Emmerich obtenait une toxine plus active en broyant, exprimant les organes de lapins ayant succombé à la septicémie pneumococcique et en filtrant à la bougie le suc obtenu ; Mosny modifie ainsi le procédé d'Emmerich :

Aussitôt après la mort, les organes des lapins sont hachés et mis à macérer dans le double de leur poids d'eau ; on ajoute quelques fragments de thymol pour empêcher la putréfaction. Au bout de vingt-quatre heures, le liquide est filtré plusieurs fois sur papier puis sur une bougie Chamberland.

III. — Issaëff, en s'adressant au sang des lapins tués par le pneumocoque exalté (Voy. plus haut), obtient une toxine capable de tuer le lapin, par injection intraveineuse, à la dose de 1 p. 100 du poids de l'animal. Il opère de la manière suivante :

1° Recueillir purement, dans le cœur, le sang de 3 ou 4 lapins ayant récemment succombé à l'inoculation du pneumocoque virulent (on doit obtenir de 80 à 100 grammes de sang) et réunir les divers échantillons de sang obtenus dans un vase stérilisé.

2° Ajouter au sang son volume d'eau stérile, glycérinée à 1 p. 100 et additionnée, pour 100 centimètres cubes, de V à VI gouttes d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. Mélanger.

3° Filtrer le mélange sur une bougie Chamberland.

La toxicité du produit obtenu diminue considérablement par un chauffage à 70° et disparaît à 100°.

En filtrant les exsudats péritonéaux et pleuraux de lapins ayant succombé à l'inoculation de virus exalté, Issaëff a également obtenu une toxine assez active pour tuer le lapin.

IMMUNITÉ. — VACCINATION.

I. **Par les toxines.** — En injectant à l'animal des cultures filtrées ou les toxines obtenues par les procédés d'Emmerich, de Mosny et d'Issaëff, on peut le vacciner contre le pneumocoque, mais l'immunisation ainsi obtenue dure peu et pour la prolonger il faut injecter des cultures vivantes à l'animal rendu réfractaire.

1° Chauffer à 58° le sérum des lapins qui viennent de succomber à l'infection pneumococcique et injecter dans la veine auriculaire d'un lapin neuf des doses de ce sérum allant de 10 à 20 centimètres cubes; au bout de quatre à cinq inoculations répétées à intervalle de quelques jours l'animal résiste à l'inoculation de cultures virulentes (Foa).

2° On arrive au même résultat en injectant de la même façon des toxines obtenues par les procédés d'Emmerich ou de Mosny.

3° Issaëff rend les lapins réfractaires en leur injectant successivement dans le sang des doses de 10 à 50 centimètres cubes de cultures stérilisées (bouillon ou sérum). Ces injections provoquant une réaction assez intense, il ne faut pratiquer la deuxième injection que lorsque les animaux paraissent guéris de la première.

Le même auteur a aussi immunisé des lapins en leur injectant des toxines retirées du sang par le procédé exposé plus haut ; il suffit d'une seule injection de toxines à la dose de 10 centimètres cubes dans le sang ou le péritoine des lapins pour les rendre réfractaires à un haut degré à l'infection pneumococcique.

Issaëff soumet les animaux immunisés à une double épreuve à l'aide de sang frais de lapin venant de succomber à la pneumococcie; il inocule sous la peau la première fois II à IV gouttes et la seconde $0^{cc},5$ de sang virulent. Pour maintenir l'immunité il répète ces inoculations tous les mois, sans jamais dépasser la dose de $0^{cc},5$ sous la peau.

Il importe, pour l'inoculation d'épreuve, d'attendre que l'animal soit complètement remis des malaises liés à l'immunisation et particulièrement que le poids ait repris une marche ascendente.

Les lapins vaccinés contre les toxines sont complètement réfractaires à l'infection par les cultures vivantes, mais ils gardent leur sensibilité vis-à-vis des toxines et réagissent même plus énergiquement que les lapins neufs quand on leur injecte ces toxines.

II. **Par les cultures atténuées.** — On peut obtenir l'immunisation en inoculant aux animaux des cultures vivantes de pneumocoques atténués (Foa et Scabia, Netter); on utilise des cultures atténuées par le vieillissement, on injecte par exemple d'abord des cultures de cinq à six jours pour arriver à donner, après des inoculations intermédiaires, des cultures de vingt-quatre heures ou du sang virulent.

SÉROTHÉRAPIE.

I. — Le sang des animaux naturellement réfractaires ne possède aucune propriété thérapeutique ni immunisante.

II. — Le sang des animaux vaccinés n'est pas antitoxique ; il est incapable de stériliser les toxines du pneumocoque *in vitro*, ou dans l'organisme (Issaëff).

Pour démontrer ce fait on mélange *in vitro* du sérum de lapin vacciné avec un volume égal d'une toxine active. On injecte le mélange dans la veine auriculaire d'un lapin neuf; un lapin témoin reçoit la même quan-

tité de toxine mélangée à du sérum normal, non vacciné. Les deux lapins réagissent d'une manière analogue.

III. — Le sérum des animaux vaccinés ne possède, *in vitro*, aucune action bactéricide sur le pneumocoque; il permet le développement de ce microbe qui y conserve toute sa virulence, malgré quelques modifications de forme (Behring et Nissen, Issaëff); les cultures sont un peu grêles, les formes arrondies y dominent.

Quand on veut vérifier la virulence d'un pneumocoque cultivé dans le sérum d'un animal vacciné, il faut se mettre à l'abri de la cause d'erreur liée à l'inoculation de la culture entière. Cette culture se compose de deux éléments : 1° les microbes; 2° le sérum où ils ont poussé; or ce sérum a, comme nous le verrons tout à l'heure, la propriété de conférer l'immunité; si on injecte la culture entière on immunise l'animal avec le sérum en même temps qu'on l'inocule avec les microbes, l'animal guérira et on conclura à l'action bactéricide du sérum. Il faut recourir à l'un des artifices suivants pour éviter cette erreur :

a). Ensemencer une trace de la culture en sérum dans un tube de bouillon neuf et inoculer la culture fille ainsi obtenue ; ce procédé peut prêter à la critique ;

b). Jeter sur un filtre de papier stérilisé la culture en sérum; laver 2 ou 3 fois les microbes restant sur le filtre avec de la solution aqueuse stérilisée de NaCl à 7 p. 1000; recueillir le résidu sur le filtre avec un pinceau, le délayer dans 2 centimètres cubes de la solution stérile à 7 p. 1000 de NaCl et injecter le mélange sous la peau.

IV. — Inoculé sous la peau à un animal neuf, le sérum des animaux vaccinés le préserve contre l'infection pneumococcique et semble même capable de guérir l'infection déclarée. Cette action est indépendante de toute influence bactéricide ou antitoxique et relève de la phagocytose.

Le sérum du lapin vacciné est très actif : II à IV gouttes de sérum d'un lapin solidement vacciné suffisent pour immuniser une souris (Foa et Carbone).

G. et F. Klemperer auraient arrêté la septicémie pneumococcique chez le lapin infecté depuis vingt-quatre heures en lui injectant 8 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné.

Les mêmes auteurs ont constaté qu'au moment de la crise, dans la pneumonie humaine, le sérum de l'homme, toxique pendant la période fébrile, devient immunisant et thérapeutique.

Les résultats obtenus sur les animaux encourageaient à essayer chez l'homme la sérothérapie de la pneumonie; plusieurs auteurs ont injecté à l'homme du sérum de lapin vacciné ou d'un pneumonique arrivé au moment de la crise; les résultats obtenus, bien que satisfaisants, ne sont pas encore assez démonstratifs pour que cette méthode de traitement se soit généralisée, la production du sérum antipneumonique étant d'ailleurs fort malaisée.

Klemperer a établi l'innocuité du sérum antipneumonique inoculé à l'homme sain ; chez des pneumoniques il injecta sous la peau des doses de 6 centimètres cubes de sérum du lapin vacciné et obtint des résultats favorables. Foa et Carbone provoquèrent la crise au quatrième jour par deux injections consécutives de 5 centimètres cubes de sérum de lapin vacciné. Foa et Scabia, Janson obtinrent de même une amélioration rapide dans plusieurs cas de pneumonie par l'injection de doses de sérum de lapin vacciné variant de 5 à 25 centimètres cubes.

Audéoud a injecté avec succès à des pneumoniques des doses de 2 à 4 centimètres cubes de sang provenant de pneumoniques ayant fait leur crise ; dans deux cas il a obtenu une amélioration considérable et la chute de la température dans les quinze heures qui ont suivi l'injection. Bouchard, Roger, Charrin, Maragliano ont obtenu des effets favorables dans les mêmes circonstances.

Pour ces recherches on peut prélever sans inconvénient du sang chez les pneumoniques entrant en convalescence, en employant la technique exposée page 190 : le sang est puisé dans une veine du pli du coude à l'aide de la seringue de Debove.

CHAPITRE X

LE BACILLE DE FRIEDLAENDER

Le bacille de Friedlaender est l'agent de certaines broncho-pneumonies; il est également susceptible de causer des suppurations; on l'a trouvé notamment dans des otites suppurées; Ch. Nicolle et Hébert ont attiré l'attention sur les angines pseudo-membraneuses causées par le bacille de Friedlaender; il peut également être associé au bacille de la diphtérie.

Le pneumobacille semble assez répandu dans les milieux extérieurs; Grimbert a signalé sa présence fréquente dans les eaux; Hébert et Nicolle l'ont rencontré dans les vases de la Seine à Rouen, nous l'avons nous-même rencontré dans plusieurs échantillons d'eau.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE.

La souris et le cobaye sont très réceptifs au bacille de Friedlaender.

Souris. — L'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité de culture amène la formation d'un abcès à pus crémeux, filant, au point d'inoculation; puis le bacille se généralise et l'animal succombe en 1 à 3 jours. A l'autopsie, la rate est hypertrophiée, le bacille se rencontre dans le sang et tous les organes. L'inoculation dans le poumon entraine également la mort avec formation d'un foyer de broncho-pneumonie.

Cobaye. — L'inoculation sous-cutanée de doses faibles de culture produit un abcès au point d'inoculation; cet abcès s'ouvre à l'extérieur donnant issue à un pus épais, contenant des bacilles de Friedlaender. A la dose de un centimètre cube et au-dessus, les cultures en bouillon tuent le cobaye; il se produit un abcès au point d'inoculation et la mort survient plus ou moins rapidement avec des lésions de broncho-pneumonie et une généralisation du bacille.

Lapin. — Une dose de plusieurs centimètres cubes de culture en bouillon injectée dans la veine marginale de l'oreille tue d'ordinaire

le lapin en peu de jours, le bacille se retrouve dans le sang et les organes.

Ch. Nicolle et Hébert en ensemençant le bacille, après excoriation, sur la muqueuse vulvaire d'une lapine, ont obtenu de la tuméfaction des grandes lèvres et un exsudat blanc, riche en pneumobacilles.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le bacille de Friedlaender se présente sous la forme de petits bâtonnets très courts, un peu larges, dont la longueur moyenne n'excède pas 1 à 2 μ. Quelquefois, cependant, dans les cultures, à côté de ces formes cocco-bacillaires, on rencontre des formes longues et même filamenteuses. Les bâtonnets sont fréquemment réunis par deux. Ils sont toujours immobiles et ne présentent jamais de spores.

Dans le pus, les crachats, le sang, le pneumobacille présente une capsule bien visible, analogue à celle du pneumocoque. Cette capsule est moins nette mais existe dans les cultures sur les milieux artificiels (Grimbert, Nicolle et Hébert).

Coloration. — Le pneumobacille se colore aisément par les couleurs basiques. Il ne prend pas le Gram. Pour la coloration des capsules, employer les procédés décrits pour le pneumocoque.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Anaérobie facultatif, le pneumobacille cultive sur tous les milieux ordinairement employés. Il se développe à partir de + 15°: la température optima de culture est aux environs de 37°.

Bouillon. — En vingt-quatre heures à 37°, apparition d'un trouble léger et formation d'un voile visqueux, surtout marqué sur les bords du tube où il forme un anneau; puis le voile tombe au fond du tube, le bouillon reste trouble et devient visqueux.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20°, dès le second jour, formation d'une petite colonie blanche, saillante à la surface de la gélatine, puis la culture s'étend le long de la piqûre et prend l'aspect typique de la culture en clou. Il ne se produit pas de liquéfaction. On voit souvent des bulles de gaz se dégager autour de la culture.

Colonies isolées. — Vers le troisième jour apparaissent de petites colonies rondes, granuleuses, blanchâtres, devenant légèrement saillantes.

Gélose. — Strie blanchâtre, épaisse et visqueuse.

Sérum coagulé. — La culture a les mêmes caractères que celle de la gélose, mais est plus abondante.

Lait. — Coagulation parfois rapide, quelquefois très lente.

Pomme de terre. — Culture épaisse, jaunâtre et visqueuse, soulevée çà et là par des bulles de gaz.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Le pneumobacille de Friedlaender, ensemencé dans de la solution de peptone à 3 p. 100, neutralisée, ne produit pas d'indol; dans une solution de peptone additionnée de nitrate de potasse, il transforme le nitrate en nitrite.

Enfin, il a la propriété de faire fermenter les sucres : glycose, galactose, arabinose, mannite, dulcite, glycérine, saccharose, lactose, maltose, raffinose, dextrine; il est sans action sur l'érythrite. Frankland a décrit un bacille se confondant quant à ses propriétés morphologiques avec le pneumobacille, mais ne faisant pas fermenter la glycérine.

Les produits de la fermentation provoquée par le pneumobacille sont : l'alcool éthylique, l'acide acétique, l'acide lactique gauche et l'acide succinique.

Pour observer et étudier la fermentation des sucres sous l'influence du pneumobacille, Grimbert recommande le milieu suivant :

Sucre fermentescible.................... .	3 grammes.
Peptone sèche..........	2 —
Eau.......................................	100 centimètres cubes.
Carbonate de chaux........................	Quantité suffisante.

L'apparition de bulles gazeuses rend manifeste la fermentation ; en remplaçant le carbonate de chaux par de la teinture de tournesol, la teinte bleue vire au rouge par la fermentation ; avec la glycérine, la fermentation est toujours plus lente à s'établir.

RECHERCHE DU PNEUMOBACILLE.

I. **Dans les crachats.** — La recherche est basée :

a). Sur l'examen microscopique des lamelles colorées à la thionine ou au violet de gentiane phéniqués. On s'assurera que le bacille se décolore par la méthode de Gram.

b). Sur l'inoculation d'un peu de crachat à la souris.

II. **Dans le sang, le pus, etc.** — L'examen microscopique, les

ensemencements, les inoculations à la souris permettront de faire facilement le diagnostic.

III. **Dans les angines pseudo-membraneuses** (Nicolle et Hébert). — *a*). Examiner les frottis de fausses membranes après coloration simple et avec la méthode de Gram.

b). Pratiquer des ensemencements sur sérum coagulé, suivant la technique employée pour la diphtérie. En quinze à vingt heures, on obtient des colonies assez grosses, rondes, grisâtres, visqueuses, faciles à reconnaître à l'œil nu et à l'examen microscopique.

IV. **Dans les eaux** (Grimbert). — Employer la méthode des passages phéniqués (Voy. p. 401) ; après deux à trois passages faire un isolement sur plaque de gélatine, les colonies de pneumobacilles, rondes, saillantes, d'un blanc mat, se reconnaissent aisément ; ensemencer une de ces colonies en bouillon et au bout de la quarante-huitième heure essayer la virulence de la culture sur la souris. Les ensemencements pratiqués avec le sang de la souris permettront d'obtenir des cultures pures.

Diagnostic avec le pneumocoque. — Le pneumobacille se distingue aisément du pneumocoque de Talamon-Fraenkel par les caractères de ses cultures en bouillon et sur gélose, par le fait qu'il donne une culture abondante sur gélatine et sur pomme de terre et enfin parce qu'il ne prend pas le Gram.

Diagnostic avec le colibacille. — Dans les analyses d'eau on est exposé à confondre le pneumobacille avec le *Bacterium coli* ; l'erreur sera facilement évitée en se rapportant aux caractères suivants :

Pneumobacille.	*Colibacille.*
Immobile dans les cultures en bouillon.	Mobile dans les cultures en bouillon.
Possède une capsule très marquée dans les humeurs et tissus et visible dans les cultures.	Ne possède jamais de capsule.
Ne produit pas d'indol dans l'eau peptonisée.	Produit de l'indol dans l'eau peptonisée.
Fait fermenter la glycérine.	Ne fait pas fermenter la glycérine.

Il convient de rapprocher du pneumobacille deux microbes, le bacille du rhinosclérome et celui de l'ozène, qui présentent les plus grandes ressemblances avec le bacille de Friedlaender.

LE BACILLE DU RHINOSCLÉROME.

Le bacille du rhinosclérome a été découvert par V. Frisch. Le rhinosclérome est une maladie chronique caractérisée par l'épaississement de la muqueuse et du squelette du nez; il peut envahir le pharynx, le larynx et même la bouche et amener la mort par asphyxie.

Le bacille du rhinosclérome est, par ses caractères morphologiques, très analogue au pneumo-bacille ; Netter et Gunther veulent réunir ces deux microbes dans la même espèce; cependant il existe des différences telles dans les propriétés de chacun d'eux qu'on ne peut les identifier.

Aspect microscopique. — Dans les coupes des tumeurs de rhinosclérome on voit à l'intérieur de cellules volumineuses, à noyau en croissant rejeté à la périphérie, des cocco-bacilles encapsulés dont la forme et les dimensions rappellent celles du pneumobacille.

Cultures. — Le bacille de V. Frisch cultive sur tous les milieux ordinairement employés. Contrairement au bacille de Friedlaender, il ne se développe pas dans les milieux légèrement acides ; il ne fait pas fermenter les sucres ; de plus, ses cultures sont beaucoup plus grêles que celles du pneumobacille (Paltauf). — Dans les cultures, le bacille de V. Frisch forme des capsules qui sont rendues apparentes par le procédé suivant : délayer sur la lamelle un peu de culture dans une goutte d'eau acétisée à 1 p. 100, sécher, colorer par le violet d'aniline. Examiner dans l'eau.

Bouillon, gélose et sérum. — Cultures analogues à celles du pneumobacille, mais plus grêles.

Gélatine. — Cultures filiformes, très limitées; la forme en clou ne se produit jamais.

Lait. — Pas de coagulation.

Inoculations. — Les animaux de laboratoire ne sont pas réceptifs vis-à-vis du bacille de V. Frisch.

LE BACILLE DE L'OZÈNE.

Le bacille rencontré dans les mucosités de l'ozène par Loewenberg et Abel se rapproche du pneumobacille plus encore que du bacille de Frisch.

L'aspect microscopique, les caractères des cultures, les résultats des inoculations sont les mêmes pour les deux microbes; la seule différence notable est, qu'à l'opposé du bacille de Friedlaender, le microbe de l'ozène ne fait pas fermenter les sucres et ne coagule pas le lait.

CHAPITRE XI

LE BACILLE DE LA DIPHTÉRIE

Le bacille de la diphtérie a été découvert par Klebs, mais la première description complète en a été donnée par Löffler.

Le bacille de Klebs-Löffler se rencontre dans les fausses membranes de la diphtérie humaine (angine diphtérique, croup, diphtérie nasale, diphtérie cutanée, etc.). Il peut aussi occasionner des angines sans formation de fausses membranes, angines dont on ne peut poser le diagnostic que par l'examen bactériologique.

Le bacille de la diphtérie se rencontre également dans la bouche et les cavités nasales des personnes ayant eu la diphtérie, et quelquefois pendant plusieurs semaines après la guérison.

Dans la bouche de beaucoup d'individus sains, on rencontre un bacille très analogue au bacille diphtérique, mais plus court et non pathogène pour les animaux de laboratoire; c'est le *bacille pseudo-diphtérique*, sur lequel nous devrons revenir au cours de ce chapitre.

Le bacille de Klebs-Löffler se rencontre uniquement dans la fausse membrane ou sur la muqueuse malade; d'ordinaire il n'envahit pas l'organisme, on ne le trouve pas dans les viscères : il cause la mort par une véritable intoxication; cependant, dans quelques cas de diphtérie grave, plusieurs auteurs l'ont rencontré à l'autopsie, soit dans le sang, soit dans les viscères (Babès, Spronck, Paltauf, Frosch, Kutscher), ces faits sont exceptionnels. On le retrouve assez fréquemment dans les foyers de broncho-pneumonie consécutifs au croup (Löffler, Kutscher).

La diphtérie sévit parfois sur les bovidés (Klein); on rencontre parfois, chez les vaches laitières, des lésions des pis (vésicules et ulcères) contenant le bacille de Klebs-Löffler; ce serait là une cause de transmission de la diphtérie à l'homme.

La diphtérie aviaire est une affection toute différente de la diphtérie humaine.

Le bacille de la diphtérie est susceptible de se conserver dans les milieux extérieurs : Park, Wright et Emerson l'ont trouvé dans les poussières de salles où des diphtéritiques étaient en traitement et sur les vêtements des infirmiers; Abel l'a rencontré sur des jouets ayant été entre les mains d'un enfant atteint de diphtérie.

DIPHTÉRIE EXPÉRIMENTALE.

Cobaye. — Le cobaye est l'animal de choix pour l'étude de la diphtérie expérimentale. L'inoculation peut être faite sous la peau, dans le péritoine, dans la trachée ou sur les muqueuses.

Inoculation sous-cutanée. — Les cultures en bouillon, âgées de vingt-quatre à quarante-huit heures, injectées sous la peau à la dose de un demi à un centimètre cube, tuent le cobaye en vingt-quatre à soixante-douze heures, suivant le degré de virulence du bacille. Il se produit rapidement un léger œdème au point d'inoculation; la température s'élève, l'animal présente de l'oppression et succombe bientôt.

Quand les cultures sont peu virulentes, le cobaye peut échapper à la mort : il se produit de l'œdème au point d'inoculation ; puis il se forme une escarre. L'escarre s'élimine et l'animal guérit.

Dans l'œdème sous-cutané les bacilles pullulent jusqu'à la sixième ou huitième heure qui suit l'inoculation; à partir de ce moment, leur multiplication s'arrête, leur nombre décroît progressivement, si bien qu'à l'autopsie on ne trouve plus qu'une quantité relativement faible de bacilles dans la sérosité de l'œdème.

Le bacille ne passe jamais dans le sang ni dans les viscères. On note à l'autopsie une congestion intense des organes (foie, poumons, ganglions) et particulièrement des capsules surrénales, un épanchement séreux abondant dans les plèvres (pouvant atteindre jusqu'à 15 centimètres cubes); cet épanchement a parfois une teinte hémorragique.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est moins sévère que l'inoculation sous-cutanée ; la mort survient plus tardivement, en quatre à douze jours. En dehors des lésions viscérales ordinaires, on trouve un épanchement péritonéal qui, seul, contient le bacille.

Inoculation intratrachéale. — Quand, après avoir pratiqué la trachéotomie, on excorie la muqueuse de la trachée et qu'on y porte une parcelle de culture du bacille de Klebs-Löffler, il se forme dans la trachée des fausses membranes produisant un véritable croup et la mort survient rapidement.

Mais la condition *sine quâ non* de réussite est que la muqueuse

trachéale ait été traumatisée, soit qu'on l'ait excoriée avec une pointe, soit qu'on l'ait cautérisée avec une tige métallique chauffée; sur la muqueuse saine, le bacille ne se développe pas.

Inoculation sur les muqueuses. — On peut reproduire des fausses membranes sur la conjonctive et la vulve du cobaye en portant sur la muqueuse une parcelle de culture; mais ici encore, il faut, de toute nécessité, que la muqueuse ait été excoriée préalablement; sur les muqueuses saines, les inoculations restent sans effet.

Lapin. — Le lapin est beaucoup moins sensible que le cobaye et ne succombe qu'à l'inoculation de cultures très virulentes.

Inoculation sous-cutanée. — L'inoculation de 2 à 3 centimètres cubes de culture en bouillon amène la mort en cinq jours environ. Il se produit de l'œdème au point d'inoculation; les lésions dominantes sont sous la dépendance des dilatations vasculaires; les viscères sont congestionnés, présentent un picté hémorragique; les ganglions de l'aine et de l'aisselle sont tuméfiés, le foie est jaune, friable et présente une dégénérescence graisseuse analogue à celle que l'on observe chez les enfants ayant succombé à la diphtérie; d'ordinaire, les poumons sont sains; on rencontre très rarement un épanchement pleural.

Inoculation intrapéritonéale. — Elle est peu sévère et exige des quantités de culture plus considérables; la mort survient lentement, les lésions sont analogues à celles notées dans le cas précédent.

Inoculation intraveineuse. — L'injection de 1 à 2 centimètres cubes de culture virulente dans la veine de l'oreille entraîne la mort en vingt-quatre à soixante heures.

A l'autopsie, on constate les lésions ordinaires et une néphrite aiguë. Il est exceptionnel de retrouver le bacille dans le sang et les viscères.

Inoculation sous-cutanée. — En appliquant un petit vésicatoire à la face interne de l'oreille et en ensemençant un peu de culture du bacille de Klebs-Löffler sur le derme mis à nu, Roux et Yersin ont obtenu de très belles fausses membranes, mais la condition indispensable de succès est de préserver de la dessiccation la surface inoculée. On y arrive en enfermant l'oreille dans un petit sac de caoutchouc, en ayant soin de ne pas comprimer les vaisseaux de la base; pour arrêter le développement de la membrane, il suffit de découvrir l'oreille.

Inoculation trachéale. — Donne encore plus aisément que chez le cobaye un croup caractéristique.

Inoculation sur les muqueuses. — Même technique que chez le cobaye.

Chien. — Le chien est sensible au bacille de Klebs-Löffler.

Inoculation sous-cutanée. — Roux et Yersin injectèrent sous la peau d'un chien une culture récente sur sérum; l'animal succomba en trois jours. On nota de l'œdème au point d'inoculation, puis il se produisit de l'ictère et une paralysie complète qui entraîna la mort. Le liquide de l'œdème contenait un petit nombre de bacilles; le sang était stérile.

Inoculation intratrachéale. — Dans un cas de Roux et Yersin, il se produisit du gonflement du cou, de l'ictère, puis la paralysie complète, et la mort survint au quatrième jour. A l'autopsie, on ne trouva pas de fausses membranes dans la trachée.

Chat. — Le chat, d'après Klein, est sensible à la diphtérie et succombe en six à treize jours à l'inoculation sous-cutanée; bien plus, un chat nourri avec le lait provenant d'une vache diphtéritique avec ulcération des pis, a contracté la diphtérie.

Vache. — Klein a montré que la vache pouvait présenter de la diphtérie spontanée et contracter la diphtérie expérimentale. Inoculées sous la peau avec une culture virulente et jeune du bacille de Löffler, les vaches succombent avec des lésions congestives des viscères. En inoculant des cultures sur gélose, vieilles de plusieurs jours, Klein n'a pu tuer les animaux; par contre, il a observé plusieurs fois sur les pis le développement d'une éruption commençant par une papule, arrivant par la vésicule à la pustule véritable, puis s'ulcérant; le contenu des vésicules renfermait le bacille de Klebs-Löffler et plusieurs fois le passage du bacille dans le lait a été constaté. Klein a observé la même éruption sur deux vaches qui succombèrent à l'inoculation d'une culture très virulente.

Pigeons et poules. — Le pigeon et la poule succombent rapidement quand on leur injecte sous la peau ou dans le muscle pectoral une culture de diphtérie en bouillon; à la dose de 1 centimètre cube, la mort arrive en moins de soixante heures. Avec des doses inférieures à 1/3 de centimètre cube, l'animal se rétablit le plus souvent; on observe quelquefois des paralysies diphtériques. A l'autopsie des animaux qui succombent, on trouve au point d'inoculation un léger enduit grisâtre et un œdème gélatineux. Quand l'injection a eu lieu dans un muscle, celui-ci est tuméfié et ses fibres ont une teinte ocreuse; les viscères présentent une congestion intense. Inoculés dans le larynx, ces animaux présentent un croup analogue à celui que l'on observe chez les lapins.

Les *petits oiseaux*, tels que les moineaux, présentent une très grande sensibilité et succombent rapidement à l'inoculation sous-cutanée.

Rats et souris. — Sont réfractaires à la diphtérie.

En résumé, le bacille de la diphtérie a pour caractère constant de ne pas envahir l'organisme des animaux réceptifs : il reste localisé au lieu d'inoculation, et à cet endroit même son développement s'arrête bientôt : les passages en série par l'animal deviennent bientôt impossibles.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Le bacille de Klebs-Löffler se présente sous forme de petits bâtonnets de dimensions très variables.

Relativement à leurs dimensions, on distingue trois variétés de bacilles diphtéritiques :

A. — *Bacilles courts*, presque cocciformes, souvent associés par deux, et disposés parallèlement les uns aux autres, mesurant en moyenne 2 μ de long sur 0,8 de large (fig. 152).



Fig. 152. — Bacille de la diphtérie dans les cultures, forme petite.

B. — *Bacilles moyens* mesurant 3 à 4 μ de long sur 0,8 de large.

Ces bacilles peuvent être disposés parallèlement les uns aux autres ou associés par deux bout à bout; souvent encore, ils sont unis par deux à angle plus ou moins aigu de manière à figurer un V ou un accent circonflexe (fig. 153).

C. — *Bacilles longs*, dont la longueur dépasse 4 et 5 μ; ces bacilles, dans les cultures, peuvent être intriqués, enchevêtrés, en forme de véritables broussailles. Ce sont ces bacilles longs qui fabriquent la toxine la plus active ; on les trouve dans les angines graves. Les bacilles courts, au contraire, sont à peu près inactifs (Martin).

Le bacille de la diphtérie est immobile, il est droit ou légèrement courbé ; ses extrémités sont arrondies, et parfois plus larges que le centre; souvent les bacilles ainsi renflés à l'extrémité ou même au

milieu, légèrement courbés, prennent un aspect caractéristique que l'on ne saurait mieux comparer qu'à celui d'un cornichon.



Fig. 153. — Bacille de la diphtérie dans les cultures, forme moyenne.

Dans les vieilles cultures, les membranes, on rencontre des formes d'involution, plus ou moins renflées en forme de poire, de massue, d'œuf, etc. On ne connaît pas de spores au bacille de Klebs-Löffler.

Coloration. — Le bacille de la diphtérie se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline. Il prend le Gram.

Dans les cultures et les frottis de membranes la coloration se fait très aisément avec le bleu composé de Roux, le bleu alcalin de Löffler ou la fuchsine de Ziehl diluée.


Fig. 154. — Bacille de la diphtérie. — Frottis de fausse membrane. — Méthode de Gram (Reich.; Obj. 1/12 im.; Oc. II).

La méthode de Gram permet d'obtenir de belles préparations avec les coupes de fausses membranes. Il faut avoir grand soin de ne pas pousser trop loin la décoloration, car la coloration du bacille ne résiste pas à l'action longtemps prolongée de l'alcool.

D'ailleurs, le bacille de Klebs-Löffler, dans les préparations montées au baume, perd assez rapidement sa coloration; pour avoir des préparations persistantes, il est bon de colorer de la façon suivante :

1° Faire agir pendant une à trois minutes la fuchsine de Ziehl diluée. Laver à l'eau.

2° Faire agir de même façon le bleu composé de Roux. Laver, sécher, monter.

Après coloration, le bacille de la diphtérie, surtout dans les vieilles cultures, présente fréquemment des espaces vacuolaires irréguliers, qui ne prennent pas la couleur ; ce ne sont pas là des spores.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille de la diphtérie cultive à partir de + 20^c ; le développement devient minime à + 40^c et s'arrête à + 42^c. La température optima est comprise entre 35 et 37^c.

Le bacille de la diphtérie est aérobie ; il se développe de préférence en présence d'un courant d'air ; on obtient cependant un développement lent dans les cultures anaérobies, mais la culture reste grêle et perd rapidement sa vitalité.

Bouillon. — Le bouillon de veau peptonisé donne des cultures plus riches que le bouillon de bœuf.

A 37^c, au bout de douze à vingt-quatre heures, il se produit de petits points blancs, grumeleux, adhérents aux parois du vase, puis il se forme un voile à la surface du bouillon ; ce voile est constitué par des amas de bacilles enchevêtrés, parmi lesquels on trouve de nombreuses formes en massue. Il se forme un précipité au fond du tube et le bouillon reste limpide.

Mais on obtient des cultures beaucoup plus luxuriantes et plus rapides quand on dispose le bouillon dans un matras de Fernbach, (fig. 155) que l'on fait parcourir par un courant d'air, pendant toute la durée du développement.



Fig. 155. — Matras de Fernbach.

Pour utiliser le matras de Fernbach, on y verse par la tubulure centrale la quantité de bouillon nécessaire pour en couvrir le fond sans atteindre le niveau des tubulures latérales. Ces tubulures latérales et la tubulure centrale sont bouchées à l'ouate ; on stérilise à l'autoclave ; l'ensemencement se pratique par la tubulure centrale, puis on la rebouche à l'ouate et on la recouvre avec un capuchon de caoutchouc. On relie une des tubulures latérales à la trompe à eau et on pratique une légère aspiration ; l'air appelé par la trompe entre par la tubulure opposée et balaye incessamment la surface du bouillon.

Dans les cultures en bouillon, il se développe dès les premiers jours une acidité très prononcée; puis la réaction devient alcaline en même temps qu'il se précipite du phosphate ammoniaco-magnésien. Dans les milieux glycérinés, la réaction acide est très marquée et persiste : le bacille perd rapidement sa vitalité dans ces milieux.

Dans les cultures anaérobies le développement est tardif et grêle et la réaction acide persiste.

Sérum solidifié. — Le sérum est le milieu de choix pour la culture du bacille de la diphtérie ; le développement y est très rapide.

Colonies isolées. (Ensemencement en surface). — Dès la dix-huitième heure, apparition de points blancs grisâtres qui prennent rapidement le volume d'une tête d'épingle; les colonies vues par transparence paraissent plus opaques à leur centre; en vieillissant, elles s'agrandissent tout en restant régulières et se colorent parfois en jaune pâle; les colonies augmentent de taille les jours suivants et peuvent arriver à avoir 5 millimètres de diamètre.

Strie. — Le long de la strie, apparition de colonies analogues à celles décrites ci-dessus, devenant rapidement confluentes et formant une bande grisâtre assez large à bords irrégulièrement découpés.

Gélose. — Les caractères de la culture sur la gélose sont les mêmes que sur le sérum solidifié; les colonies sont fréquemment plus étendues et plus blanches que sur le sérum.

Gélatine. — Sur de la gélatine dure (à 15 p. 100) à 22°-24°, on obtient un développement très grêle de petites colonies blanches, punctiformes le long de la piqûre. Pas de liquéfaction.

Pomme de terre. — Il ne se produit pas de développement apparent.

Albumine de l'œuf. — Sakaroff a récemment recommandé, pour remplacer le sérum du sang, l'albumine de l'œuf coagulée par la chaleur. Au procédé donné par Sakaroff pour la préparation des tubes de blanc d'œuf, nous préférons celui indiqué page 51 (B) plus aisé à pratiquer et qui donne de meilleurs résultats.

Sur le blanc d'œuf coagulé, l'ensemencement en surface donne, au bout de vingt-quatre heures, de petites colonies rondes à surface convexe, mates, peu transparentes, moins blanches que le fond sur lequel elles se détachent ; parfois, leur couleur vers le douzième jour tourne au jaune rougeâtre ou prend des teintes chair.

Associations microbiennes. — L'importance des associations microbiennes dans la diphtérie a été signalée pour la première fois par Roux et Yersin ; depuis, de nombreux auteurs ont étudié ces associations.

Le bacille de Klebs-Löffler se trouve rarement à l'état pur dans les fausses membranes; quelquefois, il est accompagné d'un très petit nombre d'autres microbes qui ne jouent alors aucun rôle dans le développement de la maladie, mais souvent le nombre des microbes que l'on voit à côté du bacille spécifique augmente; ces microbes interviennent dans la genèse de la maladie, constituent une véritable association et de la nature de cette association dépend la gravité de la maladie.

Les principales de ces associations sont les suivantes :

1° **Coccus Brisou.** — Roux et Yersin, Martin, ont rencontré souvent à côté du bacille de Klebs-Löffer un petit coccus qu'ils ont appelé *coccus Brisou*, du nom de l'enfant chez lequel on l'a trouvé pour la première fois. Le coccus Brisou se rencontre isolé en diplocoques ou en amas; il reste coloré par le Gram et sur sérum coagulé donne de petites colonies blanches, peu saillantes, régulièrement arrondies. « Les associations de ce coccus avec la diphtérie sont toujours bénignes. »

2° **Staphylocoques pyogènes.** — Les staphylocoques blancs ou dorés constituent une association plus grave que la précédente : les complications respiratoires sont fréquentes ; dans un cas d'association au staphylocoque doré, nous avons vu survenir, au cours de la convalescence, un phlegmon profond du cou.

3° **Streptocoque.** — Ce sont les plus graves des associations : 21 décès sur 24 cas de Martin et Chaillou avant la sérothérapie et 12 décès sur 35 cas traités par le sérum par Roux, Martin et Chaillou; la broncho-pneumonie est fréquente.

4° **Bacterium coli.** — Le bacterium coli se rencontre fréquemment dans la bouche; il est naturel qu'on le rencontre parfois dans les membranes diphtéritiques; d'après Blasi et Russo-Travalli, cette association serait grave : trois cas observés par ces auteurs se sont terminés par la mort.

Des recherches expérimentales de Blasi et Russo-Travalli, il résulte que l'association du colibacille augmente considérablement la toxicité des cultures du bacille de Löffler.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le bacille de la diphtérie se conserve très longtemps vivant dans les cultures ; les réensemencements sont fertiles même après cinq et six mois.

Pris dans une culture, à l'état humide, le bacille est très sensible à l'action des agents destructeurs.

Les cultures en bouillon se stérilisent en quelques minutes quand on les expose à une température de + 58°.

Les bacilles desséchés résistent mieux à l'action de la chaleur, et peuvent rester vivants après une exposition de plusieurs minutes à + 95°.

Mais, la résistance du bacille de Klebs-Löffler est encore beaucoup plus grande dans les fausses membranes. Une fausse membrane desséchée et exposée pendant une heure à une température de 95°-100° peut encore donner des ensemencements fertiles.

La dessiccation dans les milieux albumineux altère très peu la virulence du bacille de la diphtérie : une fausse membrane desséchée par Roux et Yersin et conservée à l'abri de la lumière à la température de la chambre donna encore des cultures après trois et cinq mois. Les bacilles provenant d'une culture sur sérum résistent moins aisément à la dessiccation, surtout quand celle-ci est rapide.

L'exposition à la lumière des fausses membranes desséchées amène assez rapidement la mort du bacille (Roux et Yersin, d'Espègne et Marignac, Ledoux-Lebard); une fausse membrane desséchée, conservée à l'air et au soleil par Roux et Yersin, ne contenait plus de bacilles vivants après un mois et demi; une culture sur sérum desséchée et étalée en couche mince a été trouvée stérile après une exposition de vingt-quatre heures à la lumière diffuse (Ledoux-Lebard).

Les antiseptiques détruisent rapidement le bacille de Klebs-Löffler dans les cultures; l'acide phénique à 1 p. 100, le bichromate à 2 p. 100 stérilisent rapidement celles-ci.

Quand on immerge des fils de soie dans une culture du bacille de la diphtérie, puis qu'on les dessèche, le bacille, sur ces fils desséchés, se montre plus résistant aux antiseptiques : il résiste plusieurs minutes à l'acide phénique à 1 p. 100, au perchlorure de fer à 1 p. 100, à l'acide salicylique en solution alcoolique à 5 p. 100, etc. (Chantemesse et Vidal). Dans les fausses membranes desséchées, la résistance du bacille aux antiseptiques est encore plus grande.

Virulence. — Pour juger de la virulence d'un bacille diphtéritique, il faut le soumettre à l'épreuve suivante :

On fait une culture en bouillon et au bout de vingt-quatre à trente heures on en inocule un centimètre cube sous la peau d'un cobaye adulte pesant 400 à 500 grammes. Plusieurs cas peuvent se présenter :

a). Si le bacille est très virulent, l'animal succombe en vingt-quatre ou trente heures.

b). Si le bacille est moyennement virulent, l'animal succombe en deux à six jours.

c). Si le bacille est peu virulent, l'animal succombe en huit à dix jours.

d). Si le bacille est très peu virulent, l'animal ne succombe pas; il se produit un œdème suivi d'une escarre.

e). Enfin, si aucune lésion ne se produit, la virulence du bacille est nulle.

La virulence du bacille retiré des fausses membranes est très variable ; dans les diphtéries graves, les bacilles virulents sont très nombreux; dans les diphtéries bénignes, on rencontre à côté de quelques colonies virulentes un grand nombre de colonies constituées par des bacilles non virulents. Dans la bouche des personnes saines, on trouve fréquemment, comme nous l'avons dit plus haut, un bacille non virulent; ce bacille, que l'on peut rencontrer aussi dans des angines non diphtéritiques, a été désigné par Löffler sous le nom de *pseudo-diphtéritique*. Löffler, Hoffmann, etc., différencient absolument ce bacille du véritable bacille diphtéritique, mais Roux et Yersin ont insisté sur les motifs qui permettent d'identifier ces deux bacilles. Le bacille pseudo-diphtéritique n'est que le bacille diphtérique atténué, dépourvu de virulence.

Les deux bacilles présentent des caractères morphologiques identiques; le bacille pseudo-diphtéritique est en général plus court que le bacille virulent (nous savons depuis les observations de Martin que la longueur d'un bacille diphtéritique permet de juger de sa virulence et il présente tous les caractères de culture que nous avons énumérés plus haut; il ne détermine jamais la mort quand on l'inocule au cobaye, mais provoque quelquefois un œdème assez marqué au point d'inoculation. La seule objection que l'on puisse faire à l'identification des deux bacilles est que l'on n'est pas encore parvenu à rendre sa virulence au bacille pseudo-diphtéritique; mais cette objection tombe devant le fait que, pas davantage, on n'est arrivé à restituer la virulence d'un bacille légitime artificiellement atténué.

Atténuation. — Dans les vieilles cultures, le bacille de la diphtérie perd beaucoup de sa virulence, mais ce n'est pas là une atténuation véritable, car un ensemencement en bouillon rend au bacille toute son activité.

Il n'en est plus de même quand on cultive un bacille virulent sur la gélose glycérinée, ou en bouillon, dans un ballon de Fernbach. en présence d'un courant d'air à 39°. Dans ces conditions, le bacille perd rapidement et d'une façon définitive sa virulence et ne produit plus que de l'œdème quand on l'inocule au cobaye (Roux et Yersin).

Le même phénomène se produit quand on conserve au contact de l'air une fausse membrane diphtéritique desséchée ; les bacilles y gardent longtemps leur vitalité ; mais, dans les cultures obtenues par des ensemencements répétés de parcelles de cette fausse membrane, on voit chaque jour croître le nombre des colonies de bacilles non virulents. Les bacilles ainsi atténués artificiellement prennent tous les caractères du bacille pseudo-diphtéritique.

Restitution et exaltation de la virulence. — On ne peut restituer sa virulence à un bacille atténué au point d'être sans action sur le cobaye (Roux et Yersin).

Au contraire, Roux et Yersin sont parvenus à exalter le bacille très peu virulent, donnant un léger œdème au cobaye : ils inoculent ce bacille mélangé à une culture virulente de streptocoque ; le cobaye succombe avec des symptômes de diphtérie et la virulence du bacille retiré de la sérosité de l'œdème est considérablement accrue.

D'après de Blasi et Russo-Travalli, l'association au colibacille exalte aussi la virulence du bacille de Klebs-Löffler.

Les passages en série chez le cobaye et le lapin n'exaltent pas la virulence du bacille de la diphtérie (Roux et Yersin). Bardach, en faisant des passages successifs chez le chien, a obtenu, au bout du vingt-cinquième passage, une exaltation de la virulence, exaltation manifeste pour le chien, mais très légère pour le cobaye.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Aujourd'hui que l'on sait que le diagnostic de la diphtérie est souvent impossible par les seules ressources de la clinique, on demande à la bactériologie le diagnostic précis de toutes les angines et particulièrement des angines membraneuses.

Ce diagnostic comporte deux ordres de recherches : on doit d'abord déterminer si l'angine ou le croup observés relèvent du bacille de la diphtérie, puis, en cas de résultat positif, déterminer la virulence du bacille isolé. Cette seconde partie de la recherche n'est pas absolument indispensable dans la pratique. Selon la règle posée par Martin, on considère comme plus virulents les bacilles à formes allongées ; d'ailleurs, au point de vue du traitement, la seule constatation de la nature diphtéritique exige le traitement sérothérapique.

Nous prendrons, comme exemple, une angine à fausses membranes, et nous décrirons la conduite à tenir en pareil cas pour obtenir un diagnostic complet. On aura recours à l'examen microscopique des frottis, aux cultures et aux inoculations. La pratique de l'examen mi-

croscopique et des cultures est de rigueur; le diagnostic réduit à ces deux temps demande un maximum de vingt-quatre heures.

Prélèvement de la fausse membrane. — On détache la fausse membrane à l'aide d'un petit tampon d'ouate hydrophile fixé à l'extrémité d'une pince à forcipressure; quand la fausse membrane est très adhérente, on la détache en la saisissant directement entre les mors de la pince à forcipressure ; quand il n'existe pas de fausses membranes, on racle légèrement la surface des amygdales ou du pharynx avec une petite spatule de platine ou de nickel.

Avant d'utiliser les fausses membranes recueillies, on les comprime très légèrement entre deux doubles de papier filtre stérilisé pour les débarrasser du mucus qui se trouve à leur surface.

Quand on veut expédier à un laboratoire éloigné un fragment de fausse membrane, on l'enveloppe dans un petit morceau de taffetas gommé que l'on place dans un petit tube de verre soigneusement bouché ; les règlements exigent que, pour les transports par la poste, ce tube soit inclus dans une enveloppe métallique contenue elle-même dans une boîte en bois; sur l'étiquette qui porte l'adresse on doit faire mention du contenu du paquet.

Examen microscopique. — Avec une parcelle de la membrane, préparer des frottis; de ces frottis, les uns seront soumis à la simple coloration, les autres à la méthode de Gram :

1° Colorer au bleu de Roux, laver, sécher. Examiner avec l'objectif à immersion homogène.

2° Si l'examen précédent a révélé l'existence de bacilles, on devra, pour pousser plus loin le diagnostic, colorer un frottis par la méthode de Gram : le bacille de Löffler reste coloré et on pourra éliminer de cette façon un certain nombre de bacilles que l'on trouve fréquemment dans la bouche et qui se décolorent par la méthode de Gram (fig. 154).

Mais quand l'examen microscopique reste négatif, il faut bien savoir qu'il est parfois difficile de reconnaître le bacille diphtérique au milieu d'un grand nombre d'autres microbes, et que lorsqu'on ne le trouve pas, on n'est pas autorisé à nier la diphtérie (Martin). Il faut en tous cas pratiquer des ensemencements.

Au point de vue du pronostic on pourra tirer des renseignements précieux de l'examen microscopique : la présence de bacilles longs indique une forme grave ; il en est de même de l'association avec le streptocoque ; la présence du coccus Brisou caractérise au contraire les formes bénignes.

Coupes. — Après durcissement à l'alcool et inclusion à la paraffine on pratique des coupes perpendiculaires à la surface de la membrane;

a méthode de Gram avec double coloration donne de fort belles préparations. Dans ces coupes, on note la présence de trois couches : a couche sus-jacente au derme est fournie par un lacis fibrineux dans les mailles duquel on voit des cellules épithéliales et des leucocytes ; au-dessus, une couche moyenne est constituée par de la fibrine granuleuse et contient peu d'éléments cellulaires ; enfin, la couche superficielle est presque entièrement constituée par les microbes ; les bacilles y sont disposés en amas dans lesquels ils sont placés parallèlement les uns aux autres ; les formes en cornichons abondent ; à côté des bacilles peuvent se trouver des microbes associés.

Cultures. — Les ensemencements doivent être pratiqués sur le sérum coagulé ou, à son défaut seulement, sur le blanc d'œuf.

L'ensemencement sera pratiqué de la façon suivante : on prend à l'extrémité de la spatule de platine ou de nickel une parcelle de fausse membrane, on porte la spatule dans le tube de sérum et on ensemence par frottement sur toute la surface du tube ; on ensemence de la même façon deux autres tubes, *sans recharger la spatule* (Voy. p. 89).

Quand il n'existe pas de fausses membranes, on pratique l'ensemencement en frottant sur le sérum la spatule avec laquelle on vient de racler la surface des amygdales ou du pharynx. Les tubes sont placés à l'étuve à 37° et doivent être examinés dès la vingtième à la vingt-quatrième heure ; dès ce moment, on reconnaît facilement les colonies du bacille de la diphtérie ; il faut savoir que certains coccus peuvent donner des colonies assez analogues, quoique plus humides et plus homogènes ; aussi ne devra-t-on pas se contenter de l'examen macroscopique, mais examiner au microscope les microbes constituant les colonies. Si l'on attendait plus de vingt-quatre heures avant d'examiner les tubes, l'observation pourrait être gênée par le développement des microbes associés ou existant dans la membrane à l'état d'impuretés. Parmi les trois tubes ensemencés, on choisira pour l'examen celui où les colonies seront le mieux isolées.

Inoculations. — Nous avons dit qu'une même fausse membrane pouvait contenir des bacilles de virulence différente ; aussi sera-t-il bon, toutes les fois que l'on voudra obtenir des résultats rigoureux, d'éprouver par les inoculations plusieurs des colonies diphtéritiques obtenues.

Pour faire cette épreuve, on opérera, pour chaque colonie, de la façon suivante : on prélève purement une parcelle de la colonie et on l'ensemence en bouillon. Quand la culture est âgée de vingt-quatre heures, on en inocule 1 centimètre cube sous la peau d'un

cobaye adulte ; l'animal meurt plus ou moins rapidement suivant la virulence du bacille (Voy. p. 329).

TOXINE.

Roux et Yersin ont démontré que la diphtérie est une intoxication causée par le poison très actif formé par le microbe dans le lieu restreint où il se développe ; ils ont mis en évidence la présence de ce poison dans les cultures en bouillon du bacille de la diphtérie.

Les premières recherches de Roux et Yersin n'avaient abouti qu'à donner un poison assez peu actif, tuant le cobaye à la dose de 30 centimètres cubes ; depuis, Roux et Martin ont obtenu un produit beaucoup plus toxique et amenant la mort rapide des cobayes à la dose de 1 dixième de centimètre cube ; nous exposerons en détail le procédé de préparation de Roux et Martin.

Préparation de la toxine diphtéritique (Roux et Martin). — Commencer par se procurer un bacille récent très virulent, que l'on éprouve par inoculation (Voy. p. 329) ; un bacille favorable doit tuer un cobaye de 300 à 400 grammes en vingt-quatre à trente-six heures à la dose d'un centimètre cube de culture en bouillon injecté sous la peau. Un bacille très virulent peut ne pas donner une toxine active ; aussi est-il bon d'avoir à sa disposition un bacille éprouvé par des opérations antérieures.

Pour l'obtention de la toxine, la culture doit être faite en présence d'un courant d'air. Pour cela, on utilise des ballons de Fernbach

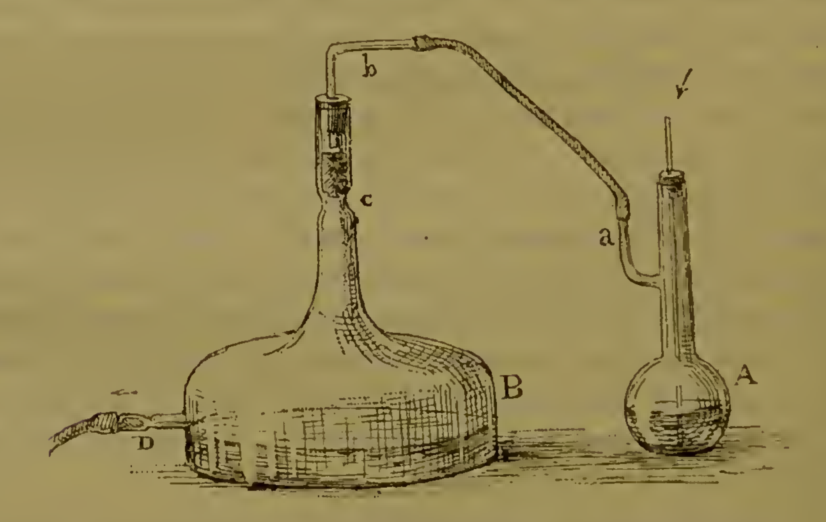


Fig. 156. — Dispositif pour la préparation de la toxine diphtéritique.

légèrement modifiés (fig. 156). Chaque ballon reçoit 400 à 500 centimètres cubes de bouillon qui ne doivent former qu'une couche

e 2 à 3 centimètres d'épaisseur. Le bouillon employé est du bouillon e bœuf peptonisé à 2 p. 100 et légèrement alcalinisé. On place un ouchon d'ouate dans la tubulure supérieure du ballon au-dessus e l'étranglement C et un autre dans la tubulure latérale D. Le ballon st stérilisé à l'autoclave; après refroidissement, on ensemence par ı tubulure supérieure et on porte à l'étuve à 37°.

Quand le développement est bien commencé, que le bouillon est rouble, c'est-à-dire vers la vingt-quatrième heure, on organise le ispositif permettant de faire passer un courant d'air à la surface de ı culture. Pour cela, on place sur la tubulure supérieure, au-dessus u tampon d'ouate, un bouchon de caoutchouc portant un tube ui relie le ballon à un flacon barboteur A contenant un peu 'eau et disposé comme l'indique la figure 156; d'un autre côté, n relie la tubulure latérale par un autre tube de caoutchouc à la rompe à eau; dès que celle-ci est mise en fonctionnement, l'air ppelé dans le ballon traverse le flacon barboteur, s'y humidifie et ient lécher la surface de la culture; avec une pince de Mohr placée ur le tube qui relie le ballon au barboteur, on règle aisément le lébit du courant d'air de sorte que les bulles crèvent continuellement nais non tumultueusement à la surface du liquide du barboteur. — l est indispensable de disposer un barboteur pour humidifier le ourant d'air, sans quoi le bouillon de culture s'évaporerait rapilement.

Pour préparer de grandes quantités de toxine, on dispose plusieurs allons identiques; il serait simple de relier la tubulure supérieure lu premier ballon à la tubulure latérale du second, dont la tubulure upérieure elle-même serait reliée à la tubulure latérale du troiième, etc., la tubulure latérale du dernier ballon étant reliée à la rompe. Mais l'expérience montre qu'il est préférable de disposer d'une ampe de cuivre reliée à la trompe et portant autant d'ajutages qu'il xiste de ballons. Chaque système constitué par un ballon et son arboteur est relié à un des ajutages.

Au bout de trois à quatre semaines, la culture est suffisamment iche en toxine; sur le fond des vases, on voit un dépôt de microbes t à la surface un voile formé par les bacilles plus jeunes; la réaction st fortement alcaline.

La culture doit alors être filtrée sur la bougie Chamberland; cette iltration ne présente rien de particulier et sera opérée, soit avec le lispositif que nous avons recommandé (p. 18), soit avec l'appareil de Martin (p. 21).

La toxine obtenue par filtration devra être conservée dans des vases stériles bien bouchés, exactement remplis et tenus à l'abri de

la lumière ; elle perd très lentement son activité dans ces conditions.

Essai de la toxine. — L'activité de la toxine n'est pas toujours la même dans des cultures faites avec le même bacille, dans des conditions en apparence identiques; aussi, faut-il toujours éprouver l'activité de la toxine que l'on a obtenue.

L'épreuve se fait en inoculant sous la peau d'un cobaye de 400 à 500 grammes un dixième de centimètre cube de toxine : dans ces conditions, une toxine active, susceptible d'être employée pour l'immunisation des animaux destinés à fournir du sérum thérapeutique, doit tuer le cobaye en quarante-huit heures et moins.

Modifications au procédé de Roux et Martin. — Le procédé de Roux exigeant l'emploi d'un matériel encombrant et beaucoup de temps, de nombreux auteurs ont cherché à le modifier et à le simplifier; jusqu'à présent, leurs recherches n'ont donné que des résultats fort médiocres.

Procédé de Spronck. — Spronck part de cette considération que la présence du glucose dans les bouillons augmente la proportion d'acide fabriqué par le bacille de la diphtérie et entrave la production de la toxine; c'est pourquoi la viande de cheval, très riche en glucose, ne convient pas à la préparation de la toxine. Or les viandes de bœuf et de veau contiennent aussi des quantités appréciables de glucose; en les débarrassant de ce sucre, on arrive, d'après Spronck, à obtenir des cultures très toxiques dans des flacons ordinaires, non aérés.

Pour obtenir ce résultat, Spronck prépare un bouillon avec de la viande de bœuf privée de glucose par le vieillissement; la viande est conservée plusieurs jours, jusqu'à ce qu'elle présente une légère odeur; on prépare le bouillon selon la méthode ordinaire en ajoutant 2 p. 100 de peptone (ne contenant pas de glucose); on alcalinise, puis on additionne le bouillon de 0,5 p. 100 de chlorure de sodium et d'un peu de carbonate de chaux.

Le bouillon est versé dans des flacons de 500 grammes, pleins aux trois quarts, et bouchés à l'ouate, qui sont stérilisés à l'autoclave et ensemencés après refroidissement. Après un séjour de trois à quatre semaines à 37°, les cultures fournissent d'après Spronck une toxine aussi active que celle de Roux et Martin.

Les recherches de Nicolle et de Macé n'ont pas confirmé les résultats de Spronck; ces auteurs n'ont pu obtenir qu'une toxine peu active par le procédé que nous venons d'exposer.

Procédé de Nicolle. — Nicolle recommande le procédé suivant :

De la viande de bœuf tué le matin même est hachée et mise à macérer une nuit à 10°-12°, dans le double de son poids d'eau. La

macération additionnée de 2 p. 100 de peptone et de 0,5 p. 100 de sel marin est portée à l'ébullition, filtrée, alcalinisée « assez fortement » et portée dix minutes à 120°, puis filtrée à nouveau et répartie dans des vases quelconques, que l'on bouche à l'ouate et stérilise quinze minutes à 115°.

Après sept jours d'exposition à l'étuve à 37°, sans courant d'air, la culture filtrée serait aussi active que la toxine obtenue par Roux et Martin.

Macé qui a expérimenté ce procédé n'a obtenu que des toxines peu actives.

Procédé de Macé. — Macé recommande l'emploi de bouillon peptonisé ordinaire additionné de 10 p. 100 de carbonate de chaux, réparti dans des ballons de 1 à 2 litres et stérilisé à l'autoclave. Après un séjour de quatre à six semaines à 37°, les cultures dans ce bouillon fournissaient une toxine aussi active que celle de Roux et Martin. Ces résultats méritent confirmation.

Effets de la toxine sur les animaux. — La toxine diphtérique injectée aux animaux sensibles produit chez eux une maladie identique à celle que cause l'inoculation des cultures vivantes.

La toxine peut être injectée sous la peau, dans les veines ou dans le péritoine; elle ne produit pas d'effet quand on la fait ingérer aux animaux.

Cobaye. — Après l'injection sous-cutanée d'un dixième à un quart de centimètre cube de toxine, il se produit rapidement de l'œdème au point d'inoculation; l'animal, dès la douzième-vingtième heure, a la respiration haletante et le poil hérissé et la mort arrive de la vingtième à la cinquantième heure, selon le degré d'activité de la toxine. A l'autopsie, on trouve des lésions identiques à celles que produit l'inoculation de la culture vivante.

Lapin. — L'injection sous-cutanée ou intraveineuse de un quart à un demi-centimètre cube amène la mort avec les lésions ordinaires ; si la dose injectée est assez faible pour ne pas entraîner la mort rapide, on observe le développement de paralysies diphtéritiques typiques et la mort survient au bout de plusieurs jours par cachexie.

Chien. — L'inoculation sous-cutanée d'un quart de centimètre cube de toxine produit, chez le chien, de l'ictère et des paralysies progressives. La mort peut terminer la scène, cependant la guérison survient assez souvent, les paralysies disparaissent peu à peu et tout rentre dans l'ordre.

Une dose de 1 centimètre tue le chien en quelques heures; on observe alors de l'ictère et une diarrhée profuse; le foie, à l'autopsie, est trouvé dur, cirrhotique.

Oiseaux. — La poule, le pigeon et les petits oiseaux succombent rapidement à l'inoculation sous la peau ou dans le muscle pectoral de quelques gouttes de toxine.

Ruminants. — Les chèvres sont très sensibles à la toxine; elles succombent rapidement à l'inoculation de 2 à 3 centimètres cubes : il en est de même des vaches qui succombent souvent à l'inoculation de 5 centimètres cubes; le mouton est un peu plus résistant: un mouton ayant reçu 5 centimètres cubes de toxine est mort en trois jours (Nocard).

Équidés. — Le cheval supporte mieux la toxine que toutes les espèces précédentes; chez beaucoup de chevaux, l'inoculation sous-cutanée de 2 à 5 centimètres cubes de toxine très active ne provoque qu'une fièvre passagère et un peu d'œdème local. L'âne est plus sensible.

Rats, Souris. — Ils sont à peu près insensibles à l'action de la toxine; pour tuer une souris, il faut injecter autant de toxine que pour tuer quatre-vingts à cent cobayes (Roux et Yersin).

Nature du poison diphtéritique. — La détermination de la nature du poison diphtéritique a donné lieu à de nombreuses recherches; Brieger et Fraenkel, Wasserman et Proskauer ont voulu en faire une toxalbumine, Gamaleia une nucléoalbumine; mais ces auteurs ne sont arrivés qu'à obtenir des produits très impurs, relativement très peu toxiques.

Roux et Yersin ont démontré que le principe actif des cultures filtrées est une substance analogue aux diastases et en présentant les propriétés capitales :

Le poison diphtéritique est tué à 100°; une exposition de douze heures à 58° affaiblit déjà son activité au point qu'un centimètre cube de toxine ainsi chauffée ne tue plus le cobaye; après chauffage à 70°, l'affaiblissement est encore plus marqué; l'inoculation de plusieurs centimètres cubes amène chez le cobaye une maladie chronique se terminant par la mort au bout de plusieurs semaines.

Comme les diastases, le poison diphtéritique a la propriété d'être entraîné par les précipités que l'on produit dans les liquides où il est dissous (réaction de Miahle). En ajoutant goutte à goutte à de la la toxine une solution de chlorure de calcium, il se produit, grâce aux phosphates contenus dans le liquide, un précipité de phosphate de chaux ; ce précipité recueilli sur un filtre et lavé est très toxique; quand on en inocule un petit grain sous la peau d'un cobaye, l'animal succombe rapidement; au point d'inoculation, il se produit de l'œdème et une petite fausse membrane grisâtre. Ce précipité est plus actif à l'état humide qu'à l'état sec; cependant il garde, après dessiccation,

une grande partie de son activité et résiste alors beaucoup mieux à l'action de la chaleur : il peut être chauffé à 70°, sans que sa toxicité soit diminuée; un petit grain du précipité desséché, placé sous la peau, peut tuer successivement trois cobayes, lorsqu'on le reporte d'un animal sur un autre.

Après une première précipitation, le liquide clair garde encore une certaine toxicité, mais on peut le précipiter plusieurs fois de suite et chaque fois le précipité entraîne une nouvelle quantité, progressivement décroissante, de poison; enfin le liquide précipité plusieurs fois et devenu très peu actif peut encore donner au cobaye, à haute dose, une intoxication chronique.

Le poison diphtéritique, soluble dans l'eau, est précipité par l'alcool, comme les diastases; mais ce mode de précipitation diminue son activité; pour obtenir cette précipitation, il est avantageux de concentrer d'abord le filtrat au dixième de son volume dans le vide à 25°; à l'extrait liquide obtenu, on ajoute quatre à cinq volumes d'alcool fort, le précipité obtenu contient le poison mélangé à de nombreuses impuretés.

La toxine obtenue par filtration peut être desséchée dans le vide jusqu'à consistance d'extrait sec; cet extrait est soluble dans l'eau; il contient le poison mélangé à une énorme proportion d'impuretés; sa solution aqueuse soumise à la dialyse abandonne rapidement les sels minéraux qu'elle contient, mais ne se dépouille que très difficilement de la toxine; ce procédé peut être employé pour purifier le poison diphtéritique.

La puissance toxique du poison diphtéritique est considérable : un centimètre cube de culture filtrée fournit un centigramme de résidu sec; or un vingt-cinquième de centimètre cube de culture filtrée est suffisant pour tuer un cobaye en quelques jours; la dose toxique de résidu sec est donc de $\frac{0,01}{25}$, soit 0,0004; de ces quatre dixièmes de milligramme, il faut défalquer la plus grande part, relevant des sels minéraux, peptone, etc.; on conçoit donc combien est infinitésimale la dose toxique.

Le poison diphtéritique est sensible à l'action de certains agents chimiques. Les ferments pepsiques le détruisent; l'alcool en atténue notablement la virulence; les agents oxydants se font remarquer par l'énergie avec laquelle ils le modifient. L'eau oxygénée, les hypochlorites alcalins, mais surtout le trichlorure d'iode et l'iode lui-même affaiblissent considérablement les propriétés toxiques du poison; l'action de ces corps a été utilisée pour atténuer la toxine destinée à servir aux immunisations.

IMMUNITÉ.

Chez les animaux de laboratoire, les injections espacées de doses très faibles de toxine arrivent très difficilement à produire l'accoutumance; il se produit une accumulation des doses, l'animal se cachectise et meurt.

I. — Fränkel parvient à immuniser des cobayes en leur injectant sous la peau des cultures diphtéritiques chauffées à 65°-70° pendant une heure; il injectait 10 à 20 centimètres cubes de ces cultures: l'immunité était acquise au bout de quatorze jours.

II. — Behring arrive à immuniser des cobayes et des lapins en injectant des doses modérées de la sérosité pleurale provenant de cobayes ayant succombé à l'inoculation des cultures virulentes; l'immunisation est obtenue quatorze ou quinze jours après l'inoculation vaccinale. Ce procédé donne des résultats très inconstants.

III. — Behring immunise des cobayes et des moutons par l'inoculation de cultures âgées de trois semaines additionnées de 1/500ᵉ de trichlorure d'iode ; après une injection de quelques centimètres cubes de mélange, l'animal est laissé au repos pendant une dizaine de jours, puis reçoit une seconde injection de culture additionnée d'une quantité moins forte de trichlorure d'iode; au bout d'une quinzaine de jours, l'immunité est acquise. Ce procédé échoue chez le lapin; dans certains cas, Behring a pu exercer une action thérapeutique en injectant du trichlorure d'iode quelques heures après avoir inoculé au cobaye une culture virulente du bacille de Klebs-Löffler.

De même, des animaux qui avaient reçu quelques jours auparavant une injection sous-cutanée d'une solution au dixième d'eau oxygénée ont résisté à l'inoculation de la culture virulente.

IV. — Brieger, Wassermann et Kitasato ont conféré l'immunité au cobaye en lui injectant une culture en bouillon de thymus chauffée quinze minutes à 70°. — Nous reproduirons l'immunisation d'un cobaye d'après ces auteurs.

Le bouillon de thymus préparé selon le procédé indiqué page 31 est ensemencé avec un bacille très virulent (le bacille employé par les auteurs tuait en quarante-huit heures un cobaye à la dose de $0^{cc},05$ de culture en bouillon). Quand la culture est complètement développée, on la chauffe pendant quinze minutes à 70°.

Un cobaye de 330 grammes a reçu	le 5 octobre	2	cent. de culture chauffée.
—	—	le 7	—	2	—
—	—	le 11	—	2	—

On lui inocule le 20, ainsi qu'à deux animaux de contrôle, un centimètre cube d'une culture en bouillon, tuant à $0^{cc},04$.

Les deux cobayes témoins meurent en trente-six heures, le cobaye traité reste vivant. Il a présenté au point d'inoculation un œdème assez volumineux, puis il s'est formé une eschare nécrotique qui s'est éliminée par la suite : le bacille diphtéritique a cultivé sur place. Mais l'organisme du cobaye était préservé contre le poison; l'animal n'est plus susceptible que de faire une diphtérie locale.

Les auteurs ont immunisé ainsi soixante-dix cobayes; néanmoins Behring et Kitasato ont démontré par la suite que cette méthode était inférieure à l'emploi du trichlorure d'iode.

V. — Roux, Nocard et Martin sont parvenus à immuniser divers animaux (lapins, moutons, chèvres, vaches, chevaux) en leur inoculant d'abord de la toxine active mélangée à de la solution iodée de Gram, puis des doses progressives de culture pure.

Un lapin, par exemple, reçoit d'abord sous la peau un demi-centimètre cube du mélange suivant, préparé au moment de l'emploi :

Toxine	2 volumes.
Solution iodée de Gram	1 volume.

Au bout de quelques jours on renouvelle l'injection et on continue ainsi pendant quelques semaines; alors on diminue la proportion d'iode et on arrive progressivement à donner de la toxine pure. Il est nécessaire de peser fréquemment les animaux et d'interrompre les injections quand ils diminuent de poids, sans quoi on déterminerait la cachexie et la mort.

La chèvre et la vache s'immunisent de même, mais sont très sensibles au poison; il est nécessaire de donner des doses très faibles de toxine iodée au début et de ne passer à la toxine pure que lorsque le sang possède un certain degré de pouvoir antitoxique; il faut savoir qu'au moment de la mise-bas, la sensibilité au poison est augmentée.

Le cheval supporte bien la toxine; c'est l'animal dont l'immunisation présente le plus d'intérêt, car on l'utilise comme producteur du sérum antitoxique. Roux, Nocard et Martin pratiquent l'immunisation de la façon suivante :

Les chevaux choisis doivent être encore jeunes (six à neuf ans), bien se nourrir et ne présenter aucune lésion des organes internes. On les soumet préalablement à l'injection de malléine pour s'assurer qu'ils ne sont pas morveux (Voy. *Morve*); on donne d'abord une petite quantité de toxine active additionnée ou non de liquide de Gram, puis les doses sont augmentées progressivement; dès la troisième injection, on donne de la toxine pure; la susceptibilité des différents individus variant beaucoup, on doit toujours commencer

par des doses sûrement inoffensives pour éviter de déterminer une réaction violente qui compromettrait la marche régulière de l'immunisation. Les injections de toxine se pratiquent sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule.

Nous reproduisons comme type l'immunisation d'un cheval par Roux et Nocard :

Cheval de sept ans, du poids de 400 kilogrammes environ. La toxine employée est très active : elle tue un cobaye de 500 grammes en quarante-huit heures, à la dose de 1/10 de centimètre cube. Elle est injectée sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule.

1er jour de l'expérience.	Injection de	1/4 c. c.	Toxine iodée au 1/10.	Pas de réaction ni locale ni générale.
2e —	—	1/2 c. c.	Toxine iodée au 1/10.	
4e, 6e, 8e jour	—	—	—	
13e, 14e —	—	1 c. c.	—	Pas de réaction.
17e —	—	1/4 c. c.	Toxine pure.	Léger œdème, sans fièvre.
22e —	—	1 c. c.	—	—
23e —	—	2 c. c.	Toxine pure.	Léger œdème.
25e —	—	3 c. c.	—	—
28e —	—	5 c. c.	—	—
30e, 32e, 36e —	—	5 c. c.	—	—
39e, 41e, —	—	10 c. c.	—	—
43e, 46e, 48e, 50e jour	—	30 c. c.	Toxine pure,	œdème assez prononcé dissipé en vingt-quatre heures.
53e	—	60 c. c.	—	—
57e, 63e, 65e, 67e jour	—	60 c. c.	—	—
72e	—	90 c. c.	—	—
80e	—	260 c. c.	—	—

Ce cheval a reçu en deux mois et vingt jours plus de 800 centimètres cubes de toxine sans présenter autre chose qu'un œdème local passager et une augmentation de température de 1° environ les soirs des jours où l'injection a été copieuse. Le quatre-vingt-septième jour, le cheval a été saigné, puis a reçu sans en être incommodé 200 centimètres cubes de toxine dans la jugulaire. Les chevaux vaccinés supportent également bien des doses massives (plusieurs centaines de centimètres cubes) de cultures vivantes.

Quelquefois les animaux manifestent une sensibilité plus grande au poison diphtérique ; après l'injection, l'animal peut présenter un œdème dur, étendu, persistant plusieurs jours, et même des sueurs et une élévation notable de température.

Pour entretenir l'état d'immunisation des chevaux, il est nécessaire de leur donner de temps en temps de la toxine. On peut, tous les vingt jours par exemple, après avoir fait la saignée, injecter dans la jugulaire une dose de 300 à 500 centimètres cubes de culture ; mais il est plus efficace d'injecter fréquemment sous la peau des doses modérées de toxine : on donnera, par exemple, tous les deux

ou trois jours 10 à 50 centimètres cubes de toxine; la saignée doit être pratiquée seulement huit à dix jours après la dernière injection de toxine.

SÉROTHÉRAPIE.

Behring et Kitasato, dans leur mémoire de 1890, ont mis en lumière les propriétés du sang des animaux immunisés contre la diphtérie. Le sang de ces animaux est capable de détruire le poison diphtéritique *in vitro* et dans l'organisme ; cette propriété se retrouve intacte dans le sérum du sang débarrassé de tout élément cellulaire. Ce sérum se montre préventif et thérapeutique sur les lapins et les cobayes intoxiqués avec le poison diphtéritique ou inoculés avec le microbe vivant. Ces faits établis, Behring, Ehrlich et leurs collaborateurs essayent d'appliquer les propriétés du sérum antidiphtéritique au traitement de la diphtérie humaine (Behring, Ehrlich, Boer, Wassermann, Rossel).

Mais la sérothérapie de la diphtérie n'est entrée véritablement dans la pratique médicale qu'après la communication de Roux et Martin au Congrès d'hygiène de Buda-Pesth, dans laquelle ces auteurs résument les recherches qu'ils ont effectuées de 1891 à 1894.

Behring et Kitasato utilisaient le mouton et la chèvre comme producteurs de sérum ; après eux, Bardach et Aronson se sont adressés au chien ; depuis les recherches de Roux, Nocard et Martin, le cheval est seul employé.

Nous exposerons en détail la pratique de la sérothérapie d'après Roux et Martin.

Préparation du sérum. — L'animal de choix est le cheval, d'abord parce que son sérum, même à doses considérables, est inoffensif pour l'homme et les animaux de laboratoire (Roux et Vaillard); puis, cet animal supporte beaucoup mieux que les autres espèces la toxine diphtéritique; enfin il est capable de fournir de grandes quantités de sérum.

Le cheval destiné à produire le sérum doit être immunisé, avec les précautions que nous avons énoncées plus haut, par l'injection répétée de petites doses de toxines; on se conformera de point en point à la technique de Roux.

Il faut environ trois mois pour que l'immunisation du cheval soit suffisante; dans l'expérience que nous avons rapportée plus haut, la dernière injection de toxine a eu lieu le quatre-vingtième jour; on laisse alors reposer l'animal pendant sept à dix jours, et au bout de ce temps, on peut recueillir du sang.

Un cheval peut fournir quatre litres de sang environ par saignée;

les saignées peuvent être répétées tous les vingt ou trente jours.

La saignée est pratiquée dans la jugulaire, on recueille le sang purement, à l'aide d'un trocart stérilisé, selon la technique qui a été exposée p. 48. Le sang est recueilli dans deux bocaux de deux litres environ et abandonné à la coagulation; les quatre litres de sang fournissent environ deux litres de sérum. Quand on possède plusieurs animaux immunisés, il est très important de mélanger le sérum fourni par un certain nombre de chevaux; on obtient ainsi un produit total, d'activité uniforme; de plus, le sérum normal de certains chevaux a la propriété de provoquer des éruptions érythémateuses, de gravité minime, mais gênantes; le mélange des sérum obvie à cet inconvénient.



Fig. 157. — Trocart pour recueillir le sang du cheval.

Pour la conservation, le sérum aspiré dans une pipette Chamberland est réparti dans de petits flacons stérilisés avec les précautions d'usage; quand le flacon est rempli, on y projette un petit fragment de camphre préalablement saisi avec une pince flambée et passé dans la flamme du gaz pour en débarrasser la surface de tout germe.

Le flacon, bouché avec un bouchon de caoutchouc stérilisé, est conservé à l'abri de la lumière.

Le sérum ainsi préparé peut être conservé, dans nos climats, plusieurs mois et même plusieurs années à l'état stérile, sans perdre de ses propriétés antitoxiques; il se produit quelquefois dans les flacons un trouble manifeste, mais ce trouble n'a aucune signification relativement à la pureté et à l'efficacité du sérum.

On peut obtenir aussi un sérum sec en desséchant le sérum dans le vide; au moment des besoins, on redissout la substance sèche obtenue dans 8 ou 10 fois son poids d'eau stérile; cette solution donne fréquemment une petite tuméfaction locale passagère que ne produit pas le sérum naturel. Dans nos pays, le sérum liquide doit toujours être employé à l'exclusion du sérum sec; celui-ci pourra présenter des avantages dans les régions tropicales où le sérum liquide perd assez vite ses propriétés.

L'immunisation du cheval producteur de sérum doit être entretenue par de nouvelles injections de toxine faites de temps en temps; nous avons dit qu'après la saignée, par la canule restant en place, on pouvait injecter en une fois dans la veine une dose de 300 à 500 centimètres de toxine, mais qu'il est plus efficace d'avoir recours aux injections répétées de petites doses sous la peau (p. 342).

Propriétés du sérum. — Essai de sa valeur antitoxique. — Quand

on ajoute du sérum d'un animal immunisé à de la toxine diphtéritique, celle-ci devient inoffensive. Cette propriété est due à une substance spéciale appelée « antitoxine » et dont la nature n'est pas mieux connue que celle de la toxine ; comme cette dernière, elle est altérée par la chaleur, précipitée par l'alcool et entraînée par les précipités formés au sein des liquides qui la renferment en dissolution.

La toxine est saturée *in vitro* et dans l'organisme par l'antitoxine (V. plus loin) ; un cobaye auquel on donne une dose suffisante de sérum supporte ensuite une quantité de toxine diphtéritique sûrement mortelle pour des cobayes non préparés ; de même, on peut injecter d'abord la toxine, puis plusieurs heures après le sérum, l'animal ne périra pas. Les animaux qui reçoivent du sérum antitoxique deviennent réfractaires à la maladie ; l'immunité se produit très rapidement, mais ne dure pas : elle a complètement disparu au bout de quelques jours ou de quelques semaines.

La quantité de sérum nécessaire pour guérir un animal qui a reçu de la toxine varie avec divers facteurs qui sont : le poids de l'animal, la quantité et l'activité de la toxine employée, et enfin l'activité du sérum. Il est très important de connaître l'activité du sérum que l'on emploie et l'on a établi des règles pour juger de cette activité.

Méthodes d'essai du sérum. — 1° Behring estime la force d'un sérum d'après la quantité nécessaire pour immuniser 1 gramme d'animal contre un volume de toxine sûrement mortel injecté douze heures après le sérum ; il dit, par exemple, qu'un sérum est *actif au millième* quand un centimètre cube de ce sérum immunise 1 kilogramme de cobaye contre une dose fixée de toxine capable de tuer dans un délai connu.

Ce mode d'appréciation n'est pas très rigoureux, mais il a l'avantage d'être commode.

2° Behring employa ensuite une autre unité de mesure : l'unité est constituée par la quantité de sérum nécessaire pour immuniser 5000 grammes de cobaye (soit 10 cobayes de 500 grammes) contre une dose dix fois mortelle d'une culture diphtéritique âgée de deux jours, le sérum étant injecté vingt-quatre heures avant la culture ; on apprécie ainsi la propriété thérapeutique du sérum contre l'infection et non contre l'intoxication.

3° Behring et Ehrlich ont adopté une nouvelle unité de mesure : l'unité immunisante ou *unité antitoxique* est représentée par $0^{cc},1$ d'un sérum qui mélangé à $0^{cc},9$ de toxine normale la neutralise au point que le mélange injecté sous la peau d'un cobaye ne produit aucun œdème. La toxine normale de Behring tue sûrement le cobaye à la

dose de $0^{cc},1$. Un centimètre cube d'un tel sérum contiendra donc 10 unités antitoxiques; un sérum tel que $0^{cc},001$ neutralise 1 centimètre cube de toxine contiendrait 1000 unités antitoxiques au centimètre cube.

4° Roux adopte comme notation le rapport entre la quantité de sérum nécessaire pour préserver de la mort un cobaye qui reçoit douze heures après l'injection de sérum une injection de un demi-centimètre cube d'une culture fraîche et bien virulente, et le poids du cobaye. Un sérum qui à la dose de 0,1 préserve un cobaye de 500 grammes, est dit actif au cinq millième, etc. Un sérum actif à 1/50 000e suffit pour le traitement de la diphtérie humaine, mais on obtient aisément du sérum actif au 70 000e et au 100 000e.

Lait antitoxique. — Le lait des femelles immunisées possède des propriétés antitoxiques (Ehrlich). Ce fait n'a guère qu'un intérêt théorique, la dilution extrême de l'antitoxine dans le lait rendant celui-ci incapable d'être utilisé dans la pratique médicale.

On peut néanmoins condenser sous un petit volume l'antitoxine que contient le lait et obtenir un produit utilisable pour les expériences de laboratoire. On s'adressera au lait de la vache ou de la chèvre; on ne peut guère obtenir qu'un lait actif au cinquantième.

Wassermann traite ainsi le lait pour y condenser l'antitoxine : à un litre de lait recueilli aseptiquement (Voy. p. 32) on ajoute 20^{cc} de solution normale de chlorure de sodium et de la présure en quantité suffisante pour obtenir une coagulation complète et rapide; le liquide clair est décanté, puis agité avec du chloroforme pour le débarrasser des corps gras; le mélange est abandonné à lui-même, puis on décante le liquide aqueux. Ce liquide est précipité par le sulfate d'ammoniaque; le précipité recueilli sur un filtre est desséché dans le vide et redissous dans une quantité d'eau dix fois moindre que la quantité du liquide où a eu lieu le précipité.

Emploi du sérum antidiphtérique. — Chez les animaux, le sérum de Roux est préventif et thérapeutique; il est efficace, non seulement quand on l'injecte avant l'inoculation de culture virulente, mais encore quand on le donne à l'animal douze et dix-huit heures après l'infection. Ce sérum n'est pas antitoxique au sens propre du mot; il n'agit pas, à vrai dire, sur la toxine, mais sur les cellules des animaux auxquels il est injecté et rend ces cellules, pour un temps, insensibles au poison.

Chez le cobaye, l'injection de sérum pratiquée avant l'inoculation vulvaire ou trachéale n'empêche pas le développement de la fausse membrane, mais préserve l'animal de toute intoxication, de toute maladie générale; dès le second jour, les fausses membranes se détachent

t la réparation de la muqueuse commence. Pratiquée après production expérimentale des fausses membranes sur les muqueuses du obaye, l'injection de sérum amène au bout de quelques heures ı disparition de l'œdème et de la tuméfaction et, dès le deuxième jour, ı chute de la fausse membrane.

Les fausses membranes produites dans la trachée du lapin par 'association du streptocoque et du bacille de Klebs-Löffler résistent eaucoup plus à l'action du sérum; une injection de 5 et même de 0 centimètres cubes de sérum ne suffit pas à sauver l'animal; cependant Roux et Martin sont arrivés plusieurs fois à guérir des lapins ınsi infectés en répétant à plusieurs reprises les injections de sérum.

Roux et Martin ont essayé dans ces cas le mélange des deux sérum ıntistreptococcique et antidiphtérique, mais les résultats ne sont ıas encore concluants (Voy. *Streptocoque*).

L'application de la sérothérapie au traitement de la diphtérie ıumaine a donné les résultats que permettait de prévoir l'expérimentation sur les animaux; la sérothérapie de la diphtérie constitue ıujourd'hui un des plus beaux chapitres de la thérapeutique.

CHAPITRE XII

LE BACILLE DU TÉTANOS

Le bacille du tétanos a été découvert par Nicolaïer. On sait que le tétanos de l'homme peut succéder à une blessure accidentelle ou à une opération chirurgicale qui ont introduit le germe spécifique dans l'organisme ; on a beaucoup parlé aussi d'un tétanos dit spontané, se développant en l'absence de toute solution de continuité des téguments pouvant expliquer l'introduction du virus dans l'organisme ; ces faits de tétanos spontané relèvent, soit d'une infection par l'intestin, soit plutôt de l'introduction ancienne de germes dans l'organisme à la faveur d'une plaie depuis longtemps cicatrisée et oubliée : Vaillard et Rouget ont montré que les spores introduites dans l'organisme peuvent y sommeiller pendant un temps très long, germer ensuite sous l'influence de causes diverses et provoquer un tétanos qui semble spontané.

On rencontre le tétanos chez toutes les espèces animales domestiques ; c'est principalement à la suite des plaies du pied qu'apparait le tétanos chez le cheval, l'âne, la vache, etc. ; on a vu souvent le tétanos sévir en quelque sorte d'une manière épidémique sur des séries de chevaux soumis à la castration ; les germes étaient, dans ce cas, transportés par les casseaux.

Le germe du tétanos est très répandu dans les milieux extérieurs ; quand on inocule à un cobaye de la terre de jardin, de la boue de rue, il succombe à peu près fatalement au tétanos ou à la septicémie de Pasteur (Nicolaïer) ; de même, le bacille de Nicolaier se rencontre dans le contenu intestinal et les fèces d'un grand nombre d'animaux ; Vaillard l'a trouvé dans le dépôt abandonné par de l'eau de Seine sur une bougie Chamberland ; dans les milieux extérieurs, le bacille du tétanos se rencontre à l'état de *spores*.

INOCULATION AUX ANIMAUX.

Parmi les animaux de laboratoire, la souris, le rat, le cobaye sont très sensibles au tétanos ; le lapin l'est à un degré moindre ; le chien est très résistant ; le pigeon et la poule sont réfractaires.

On peut donner le tétanos aux animaux réceptifs de plusieurs manières différentes :

1° Par l'inoculation de pus pris au niveau d'une plaie tétanique de l'homme ou d'un animal.

2° Par l'inoculation de terre.

3° Par l'inoculation d'une culture pure du bacille de Nicolaïer ;

4° Par l'inoculation de spores tétaniques isolées des cultures.

Quel que soit le mode d'inoculation employé, on observe un fait constant, c'est que le bacille du tétanos n'envahit jamais l'organisme : on ne le retrouve absolument qu'au lieu de l'inoculation. Comme le bacille de la diphtérie, le bacille du tétanos donne dans l'organisme une culture très minime ; au bout de quelques heures, le nombre des bacilles est en voie de diminution et bientôt on ne peut plus constater la présence du germe que par les cultures ; les passages d'animal à animal ne peuvent se faire en série illimitée. Quand on a inoculé une culture à dose strictement suffisante, les produits recueillis après la mort dans la région infectée ne sont pas réinoculables ; au contraire, le pus recueilli dans la plaie d'un tétanique est inoculable aux animaux réceptifs, mais il est impossible d'effectuer plus de quatre passages, au maximum ; dès le second passage, l'animal inoculé meurt moins rapidement. Le tétanos, comme la diphtérie, résulte de l'intoxication par les produits sécrétés par le microbe.

Inoculation de terre ou de pus tétanique. — L'inoculation se fera de préférence sous la peau ou dans les muscles de la cuisse chez le cobaye ou la souris.

Au lieu d'inoculation, il se produit une tuméfaction qui peut devenir considérable après l'inoculation de terre ; la région est empâtée et douloureuse, puis au bout de trois ou quatre jours apparaissent les symptômes du tétanos. Le tétanos commence toujours par les régions les plus voisines du lieu inoculé ; dans le cas actuel, la rigidité du membre postérieur inoculé sera le premier symptôme, puis les contractures se généralisent ; il se produit des attaques convulsives, sous l'influence des plus légères excitations (attouchement, courant d'air, bruit, etc.) ; le tableau symptomatique reproduit exactement celui que l'on observe chez l'homme, et la mort

survient vingt-quatre à quarante-huit heures après le début des accidents.

A l'autopsie, on trouve au point d'inoculation, soit un foyer purulent, soit une sorte d'escharre jaune et sèche ou un exsudat membraneux, épais et cohérent ; les tissus voisins sont le siège d'une infiltration œdémateuse (Vaillard et Rouget). A l'examen microscopique, on trouve constamment à côté du bacille de Nicolaïer de nombreux microbes associés parmi lesquels une ou deux espèces dominent ; les lésions purulentes, membraneuses, nécrotiques sont dues à ces microbes associés. Les viscères sont sains et présentent seulement une légère congestion liée à la gêne respiratoire qui précède la mort.

Inoculation de cultures pures (Vaillard et Rouget). — Les inoculations de cultures pures peuvent être pratiquées sous la peau, dans les muscles, le péritoine, les veines, sous la dure mère, sur la conjonctive oculaire ; seule, l'inoculation par les voies digestives échoue ; la voie sous-cutanée ou intra-musculaire constitue le mode d'infection le plus rapide et le plus sûr.

Des doses très faibles de cultures en bouillon suffisent pour conférer le tétanos aux animaux réceptifs : un cinquantième de centimètre cube donne à la souris et au cobaye un tétanos typique débutant douze à vingt heures après l'inoculation et entraînant la mort en trente-six ou quarante heures. Le lapin exige des doses de $0^{cc},5$ à $1^{cc},5$, encore les premiers symptômes ne surviennent-ils que du deuxième au huitième jour et la mort seulement trois à dix jours après le début du tétanos.

Quelle que soit la dose de culture inoculée, il se produit avant l'apparition des premiers symptômes une période d'incubation dont la durée varie avec l'action de la culture, la dose injectée et la résistance de l'animal ; en règle générale, le tétanos est d'autant plus intense et plus rapidement mortel que la période d'incubation a été plus courte. Quand cette période dépasse quatre à cinq jours chez le cobaye et huit jours chez le lapin, le tétanos prend la forme chronique, dure dix à trente jours et peut aboutir à la guérison.

En tous cas, le tétanos commence par la région inoculée, puis se généralise ensuite si la dose de culture injectée est suffisante ; si cette dose est extrêmement faible, les symptômes tétaniques peuvent rester limités au membre ou au groupe de muscles intéressés par l'inoculation.

A l'autopsie, on ne trouve aucune lésion au point d'inoculation ; quequefois cependant, il existe un peu d'hyperhémie ou un œdème léger, très circonscrit. Il n'existe aucune lésion des viscères.

Le bacille du tétanos injecté en culture ne pullule pas dans l'orga-

nisme des animaux, et, au contraire, y disparaît rapidement : déjà, au bout de huit à dix jours, le nombre des bacilles est très minime ; après vingt-quatre heures, on ne peut souvent pas constater la présence des bacilles par l'examen microscopique ; mais en ensemençant un petit lambeau du tissu conjonctif prélevé au point d'inoculation, on obtient toujours une culture, même quand la mort n'est survenue que plusieurs jours après l'inoculation. Les produits recueillis dans la région infectée ne sont jamais inoculables.

Les cultures filtrées sur la bougie Chamberland provoquent absolument les mêmes symptômes que les cultures entières ; nous reviendrons plus tard sur ce fait, mais, dès à présent, il suffit à établir que la culture inoculée provoque le tétanos grâce à la toxine qu'elle contient.

Inoculation des spores pures (Vaillard, Vincent et Rouget). Étant donnée une culture tétanique sporulée, en bouillon, on peut isoler les spores qu'elle contient. Quand on chauffe une culture sporulée pendant trois heures à 80°, la toxine est détruite et le liquide ne contient plus que des spores qui n'ont été aucunement atteintes par le traitement.

On peut inoculer au cobaye des doses de 1/2 et 2/3 centimètre cube de ces cultures ne contenant que des spores sans que l'animal présente aucun symptôme de tétanos : les spores pures ne germent pas dans les tissus sains et ne peuvent, par conséquent, y produire la toxine indispensable au développement du tétanos.

Les recherches de Vaillard, Vincent et Rouget ont montré que les spores ainsi injectées à l'état pur sont rapidement englobées et détruites par les phagocytes.

Si on ajoute aux spores, avant de les injecter, une substance chimiotaxique négative, telle qu'une gouttelette d'acide lactique, par exemple, les leucocytes ne peuvent aborder les spores, celles-ci abandonnées à elles-mêmes ne tardent pas à germer et le tétanos éclate. On arrive au même résultat en protégeant mécaniquement les spores contre les phagocytes, par exemple en mélangeant les germes avec un peu de sable stérile et en enfermant le tout dans un petit étui de papier filtre préalablement stérilisé ; le sac de papier constitue une barrière que ne peuvent franchir les leucocytes, les spores germent à son intérieur, fabriquent la toxine et l'animal succombe au tétanos.

Quand on produit au point d'inoculation un traumatisme tel qu'une brûlure, une attrition violente des tissus, etc., la phagocytose se trouve entravée, les leucocytes ne peuvent plus aborder les spores, celles-ci se développent et le tétanos se manifeste.

Aussi curieux et important dans l'étiologie du tétanos est le rôle des microbes favorisants : quand un animal succombe à l'inoculation d'une terre tétanigène on trouve dans le pus, à côté du bacille de Nicolaïer, des microbes étrangers; Vaillard et Rouget ont isolé plusieurs de ces microbes et ont obtenu des cultures qui, mélangées à des spores pures, favorisaient le développement du tétanos de la même façon que l'adjonction d'une substance chimiotaxique négative; la terre qui contient des spores tétaniques ne donne le tétanos que si elle renferme en même temps de ces microbes favorisants.

Expérience. — On prend une petite quantité de terre tétanigène et on la divise en deux lots : un lot est gardé comme témoin, l'autre est délayé avec soin dans de l'eau stérile, aspiré dans une pipette à étranglement, scellé dans cette pipette et chauffé pendant une heure à 85°. Les spores tétaniques résistent à ce chauffage ; au contraire, les microbes non sporulés sont tués. Si on inocule à des cobayes de la terre non chauffée, ces cobayes succombent au tétanos; au contraire, les cobayes ayant reçu la même quantité de terre chauffée restent indemnes.

D'autre part, on a fait des cultures aérobies avec la même terre: ces cultures injectées à des cobayes provoquent des lésions purulentes, mais jamais le tétanos. Inocule-t-on à un troisième lot de cobayes un peu de terre chauffée additionnée d'une petite quantité de la culture aérobie, les animaux succombent tous au tétanos.

Vaillard et Rouget ont pu isoler plusieurs microbes jouissant de ces propriétés favorisantes.

CARACTÈRES MICROBIOLOGIQUES.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Le bacille du tétanos se rencontre tantôt sous la forme non sporulée, tantôt sous la forme sporulée.

Dans les cultures jeunes, dans certains pus, il affecte la forme de minces bâtonnets, très fins, allongés, à bouts non arrondis, mesurant 0,3 à 0,4 μ de large sur 3,5 μ de long ; dans cet état, le bacille possède une légère mobilité : à l'abri de l'oxygène, il présente des mouvements lents et flexueux ; ces mouvements cessent dès que se forme la spore.

Dans les cultures à 37° âgées de trente-six et quarante-huit heures et quelquefois dans le pus on rencontre des formes sporulées : vers le dixième jour on ne trouve guère dans ces cultures que des bacilles avec spores; dans les cultures à 20-25°, la formation des spores est tardive et ne commence guère qu'au dixième jour.

Les bacilles sporulés se présentent sous la forme de bâtonnets grêles assez courts, portant à une de leurs extrémités une petite

sphère exactement terminale, arrondie, réfringente et dont le diamètre mesure deux à quatre fois la largeur du bacille: c'est la forme dite en *épingle*.

Dans les vieilles cultures, le corps du bâtonnet se désagrège et



'ig. 158. — Bacille du tétanos. — Pus de cobaye (association avec un coccus). — Thionine phéniquée. (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Fig. 159. — Bacille du tétanos. — Culture en bouillon. — Formes sporulées. — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 1/12 imm; Oc. II).

'on ne voit plus que les spores; à côté de celles-ci, on peut rencontrer les formes d'involution renflées, irrégulières, en haltères, etc.

Coloration. — Le bacille du tétanos se colore aisément par les :ouleurs basiques d'aniline; il prend le Gram. Quand on colore des acilles sporulés par les méthodes ordinaires, les bâtonnets seuls et es contours des spores fixent la matière colorante; le centre de :elles-ci reste incolore, on a une figure très caractéristique rappeant l'aspect d'une raquette.

On colore aisément les spores par un des procédés exposés page 149.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille du tétanos est anaérobie; il st cependant moins exigeant sous ce rapport que le vibrion septique t est susceptible de se développer dans des milieux contenant ncore de faibles proportions d'oxygène; on peut l'habituer à vivre lans un air très peu raréfié. Dans la pratique des cultures, il importe néanmoins de le traiter comme un anaérobie strict.

Il se développe entre + 14° et + 43°; au-dessous de 20°, la culure est à peine appréciable; les spores se forment très lentement

entre 20c et 25c. La température optima est aux environs de 38c. Le bacille se développe rapidement à 42c et 43c, mais à ces températures, un très petit nombre de bâtonnets forment des spores.

Le bacille de Nicolaier se développe sur les milieux usuels à base de bouillon, neutres, légèrement alcalins ou légèrement acides, mais il est indispensable que ces milieux soient préparés avec du *bouillon frais* (Kitasato). Le bouillon de bœuf ordinaire lui est très favorable; au contraire, les liquides organiques comme l'albumine de l'œuf, le sérum frais, etc., donnent des cultures peu abondantes.

Bouillon. — Dans des tubes de Roux (p. 100), ou dans le flacon décrit p. 103, le développement est rapide entre 37c et 39c; vers la vingt-quatrième heure apparaît un trouble général, en même temps que de fines bulles de gaz gagnent la surface du liquide; le trouble s'accentue les jours suivants, puis, vers le quinzième jour, la culture se ralentit et il se forme un précipité au fond du vase; le bouillon s'éclaircit.

Pendant la culture, il se dégage en quantité modérée de l'hydrogène, de l'azote et des carbures d'hydrogène; la culture dégage une odeur puante caractéristique que l'on a comparée à celle de la corne brûlée.

Gélatine. — *Culture en profondeur.* — La piqûre profonde dans un tube de gélatine privé d'air (p. 105), donne au bout de quatre à six jours, aux environs de 20c, un développement de petits points nuageux, d'où partent, à angle droit, de très fines et nombreuses aiguilles; le nuage s'étend, envahit progressivement la gélatine et commence à la liquéfier vers le dixième jour; il se forme alors au fond du tube un dépôt floconneux au-dessus duquel la gélatine est claire et fluide. Les spores ne se forment que lorsque la liquéfaction a commencé; alors seulement la culture devient active; il se forme quelques bulles gazeuses pendant la culture.

Colonies isolées (Tube de Vignal). — Vers le quatrième ou sixième jour, apparition de petits points blanchâtres, formant bientôt des sphères nuageuses d'où partent de fins rayons disposés en houppe; des bulles de gaz se produisent au voisinage des colonies; vers le dixième ou quinzième jour, la liquéfaction commence et se poursuit lentement; les colonies forment des flocons blanchâtres nageant dans la gélatine liquéfiée.

Gélose. — Les ensemencements en piqûre profonde à 37c donnent rapidement lieu au développement d'une culture nuageuse peu caractéristique; il se produit de nombreuses bulles de gaz qui fragmentent la gélose.

Sérum coagulé. — Le sérum coagulé en tubes analogues à ceux de gélose et recouvert après l'ensemencement d'une couche de

gélose convient bien au développement du bacille de Nicolaïer. La culture présente le même aspect que dans la gélose; le sérum n'est pas liquéfié (Sanchez Toledo et Veillon).

Pomme de terre. — Sur la pomme de terre disposée dans le tube



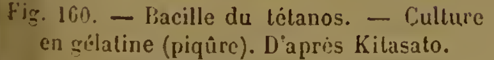


Fig. 160. — Bacille du tétanos. — Culture en gélatine (piqûre). D'après Kitasato.



Fig. 161. — Bacille du tétanos. — Culture en gélatine (colonies isolées). D'après Fraenkel et Pfeiffer.

de Roux pour culture anaérobie, le bacille de Nicolaïer pousse difficilement ; il forme « une couche mince, humide, luisante, assez semblable à celle que donne le bacille typhique, composée de très longs bâtonnets, sans renflement ni spore ». (Vaillard et Vincent.)

Lait. — Le bacille du tétanos se développe dans le lait sans le coaguler.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

Vitalité. — La spore du bacille du tétanos lui assure une grande résistance aux agents de destruction ; la spore tétanique est une des plus résistantes à l'action de la chaleur.

En vase clos, en milieu humide, les spores supportent pendant six heures une température de 80°, et pendant plus de deux heures une température de 90°. Elles résistent trois à quatre minutes à la température de l'ébullition, mais sont sûrement détruites à cette température au bout de huit minutes.

Desséchées, les spores mêlées à de la terre et conservées à l'air libre, à l'abri de la lumière, conservent pendant plusieurs mois leur vitalité et leur virulence (Kitasato), mais l'exposition de spores desséchées sur un papier ou un fil de soie à l'air et à la lumière diffuse ou à la radiation solaire leur fait subir rapidement des modifications profondes; leur germination devient d'abord moins rapide et leur culture moins active, puis elles donnent naissance à des bacilles asporogènes et non pathogènes; enfin elles périssent. Tous les termes de cette série se trouvent réalisés en moins d'un mois ; dans une expérience faite au mois de juillet, des spores desséchées, exposées à la lumière diffuse et au soleil, quand il paraissait, ont été tuées en douze jours (Vaillard et Vincent).

Mais quand la lumière agit à l'abri de l'air, les spores desséchées résistent beaucoup mieux : après plus de deux mois, dont cinquante-neuf heures d'insolation, les spores ont encore germé et donné des bacilles sporulés et très actifs (Vaillard et Vincent).

Le bacille du tétanos dans les couches superficielles du sol est donc exposé à des causes incessantes de destruction et d'atténuation ; il disparaîtrait rapidement s'il ne trouvait dans son passage à travers le tube digestif des herbivores des conditions favorables à son entretien et à sa multiplication (Sanchez Toledo et Veillon).

Desséché dans le pus, les liquides albumineux, dans les corps poreux, tels qu'échardes de bois provenant de plaies tétaniques, le bacille tétanique garde longtemps sa vitalité et sa virulence.

RECHERCHE ET ISOLEMENT DU BACILLE DU TÉTANOS.

Quand on veut rechercher et isoler le bacille de Nicolaïer dans une terre, on inocule à un cobaye un fragment de cette terre, puis on isole le bacille du cadavre de l'animal selon la méthode que nous allons exposer.

La recherche du bacille du tétanos dans le cadavre d'un homme ou d'un animal doit être opérée exclusivement au niveau de la plaie tétanique. Nous savons que le bacille de Nicolaïer ne se généralise pas; le bacille du tétanos ne passe jamais dans le sang; cependant, quand on inocule dans les veines ou le péritoine du cobaye de grandes doses de cultures, on obtient des ensemencements féconds avec des quantités copieuses de moelle osseuse, de foie, de rate, etc. (Vaillard et Vincent); mais ce sont là des conditions toutes spéciales.

La recherche sera conduite de la façon suivante :

Examen microscopique. — Préparer des lamelles avec du pus ou des produits membraneux recueillis dans la plaie, colorer par le krystal-violet phéniqué ou la fuchsine phéniquée ; dans ces frottis, on pourra rencontrer le bacille, soit sous la forme sporulée, soit asporulé; on devra soumettre quelques-unes des lamelles à la réaction de Gram ; le bacille du tétanos reste coloré par ce procédé.

Il est souvent nécessaire de préparer un grand nombre de lamelles pour rencontrer le bacille qui peut exister en quantité minime et dont la présence peut être masquée par le grand nombre des microbes associés. Rarement le bacille est en quantité notable et les microbes associés sont rares; la figure 158 reproduit une lamelle de pus obtenue dans un cas de ce genre ; ici, la recherche est facile et rapide.

De ce que l'on n'a pas rencontré le bacille à l'examen microscopique, il ne faut pas rejeter l'hypothèse de l'existence du germe, mais livrer le pus à l'épreuve des cultures.

Cultures, isolement. — Kitasato a le premier indiqué une méthode permettant d'extraire le bacille du tétanos, à l'état de pureté, d'un pus tétanique; le procédé de Kitasato, basé sur la résistance de la spore à la chaleur et sur les propriétés anaérobies du bacille de Nicolaïer, a été modifié par Vaillard et Vincent ; c'est la méthode de ces auteurs que nous exposerons en détail :

1° Ensemencer le pus ou le produit tétaniques dans du bouillon de bœuf et cultiver dans le vide à 38° — 39°.

2° Dès le cinquième ou sixième jour, le bouillon troublé contient de nombreux bacilles en épingle mêlés à d'autres microbes anaérobies ; on aspire un peu de la culture dans un tube effilé à la lampe, dont, après remplissage, on scelle les deux extrémités par un trait de chalumeau. Le tube ainsi préparé est soumis pendant une ou deux minutes à la température de 100°. Ce chauffage respecte les spores du tétanos, mais tue la plupart des germes étrangers.

3° Le contenu du tube chauffé est mis en culture en bouillon dans le vide; dans la culture obtenue, le bacille du tétanos domine et

peut même se trouver à l'état pur. En répétant deux ou trois fois le chauffage et la culture dans les mêmes conditions, il est possible d'obtenir le bacille du tétanos à l'état pur.

4° Souvent cependant, le bacille de Nicolaïer reste mélangé au vibrion septique et à un autre bacille anaérobie, non pathogène et à spore non exactement terminale. Dans ce cas, l'opération devra être terminée par un isolement en tube de Vignal. On ensemence un tube de gélatine avec une trace de culture et on en aspire le contenu dans des tubes de Vignal (Voy. p. 112). On reconnaît aisément les colonies isolées du bacille de Nicolaïer aux caractères que nous avons exposés plus haut; on prélève purement une trace d'une colonie et on la reporte en bouillon.

Inoculations. — On peut inoculer directement au cobaye ou à la souris un peu de pus ou un petit fragment isolé dans la plaie tétanigène; les symptômes du tétanos apparaissent rapidement chez l'animal inoculé.

LA TOXINE TÉTANIQUE.

I. — Brieger, Verhoogen et Boer, Kitasato ont isolé des cultures tétaniques des substances possédant les caractères des ptomaïnes et à l'action desquelles ils ont attribué les symptômes du tétanos; mais les résultats obtenus par ces auteurs prêtent à la critique et il est reconnu aujourd'hui que les ptomaïnes ne sont pour rien dans la toxicité des cultures du bacille de Nicolaïer.

II. — Knud Faber, filtrant des cultures de tétanos en bouillon, obtint un liquide très toxique dont l'inoculation produit chez les animaux un tétanos typique. Vaillard et Vincent ont repris et étendu les recherches de Knud Faber et ont donné une étude complète de la toxine tétanique.

Préparation de la toxine. — On ensemence le bacille dans du bouillon de bœuf peptonisé disposé dans un flacon selon le procédé indiqué page 103. Après quatre à cinq semaines de culture à l'étuve à 36°, à l'abri de l'air, la culture est filtrée sur la bougie Chamberland comme il a été dit page 18. On obtient ainsi un liquide très toxique, tuant la souris à la dose de 1/4000 de centimètre cube injecté sous la peau.

On peut encore augmenter d'une manière remarquable la toxicité des cultures en bouillon en utilisant la propriété du microbe de se développer dans un milieu où une première génération a déjà vécu et élaboré son poison. Une culture en bouillon âgée de vingt jours est filtrée sur la bougie; dans le filtrat, on ensemence de nouveau du bacille tétanique. Au

bout de vingt jours, on filtre de nouveau; au filtrat, on ajoute environ 1/15 du bouillon neuf stérile, puis on ensemence une troisième fois avec le bacille. Cette troisième culture filtrée donne une toxine capable de tuer les souris au cent-millième de centimètre cube.

L'expérience a montré que la composition du milieu de culture influe beaucoup sur l'activité du poison ; le bouillon de bœuf peptonisé est l'un des milieux les plus favorables.

Action de la toxine sur les animaux. — L'inoculation de doses minimes de toxine produit un tétanos mortel.

Les toxines les plus actives obtenues par Vaillard et Vincent tuent le cobaye au millième de centimètre cube, la souris au 1/100 000e.

Quand on injecte une quantité moindre de toxine, on détermine un tétanos local intéressant uniquement les muscles voisins du point d'inoculation ; la toxine se comporte alors comme un poison neuro-musculaire.

La toxine tétanique se diffuse très rapidement dans l'organisme; si on en injecte une fraction de goutte vers l'extrémité terminale de la queue d'un rat, région où l'absorption est très lente, on peut, trois quarts d'heure après l'injection, sectionner la queue à 2 ou 3 centimètres au-dessus du point inoculé sans que l'évolution de la maladie soit modifiée; l'animal meurt presque aussi rapidement que le témoin.

Nature du poison. — Vaillard et Vincent insistent sur l'extraordinaire activité du poison tétanique ; un centimètre cube de toxine évaporée dans le vide donne un résidu fixe de 0^{gr},040: soumis à la calcination, ce résidu subit une perte de 0^{gr},025 représentant la matière organique ; admettons, ce qui est évidemment inexact, que la totalité de la matière organique soit constituée par la toxine elle-même, il en résultera que ces 25 milligrammes de toxine peuvent tuer cent mille souris, ce qui porte la dose mortelle du principe actif à 0^{gr},000 000 25 pour une souris ; or, sur cette quantité, une très large part appartient aux principes inactifs (peptones, etc.).

Le poison tétanique présente tous les caractères des enzymes ou des diastases (Knud Faber, Tizzoni et Cattani, Vaillard et Vincent) ; chimiquement, il est très analogue à celui de la diphtérie.

Le poison tétanique est profondément altéré par un chauffage de trente minutes à + 65^{c} ; il est détruit complètement par un chauffage de trois heures à + 80^{c}.

Conservé en vase clos, à l'abri de l'air et de la lumière, la toxine garde longtemps son activité ; mais elle s'affaiblit rapidement quand elle est exposée à la lumière diffuse et à l'action de l'air ; sous

l'influence des rayons solaires et de l'air, la toxicité disparaît en peu de jours.

Le poison tétanique a la propriété d'adhérer aux précipités amorphes que l'on produit au sein des liquides où il est en dissolution ; l'addition de chlorure de calcium à la toxine détermine un précipité de phosphate de chaux qui entraîne une partie de la substance active ; après un lavage soigneux, un petit fragment de ce précipité gros comme la tête d'une épingle détermine, quand on l'insère sous la peau d'un cobaye, un tétanos mortel en une trentaine d'heures ; après précipitation, il reste encore une grande quantité de toxine en dissolution dans le liquide.

Un peu de toxine tétanique obtenue par filtration, versée dans un tube de gélatine stérile, liquéfie en quelques jours cette gélatine : le phénomène est dû à l'existence dans la toxine d'un ferment diastasique liquéfiant, ferment qui semble être différent de la substance toxique.

Évaporée à + 25° dans le vide sur l'acide sulfurique, la toxine laisse un résidu brun, amorphe, extrêmement toxique. L'alcool à 90° dissout une faible quantité de ce résidu et laisse, après évaporation, une substance blanc grisâtre, présentant une odeur vireuse, et non toxique.

La partie du résidu non dissoute par l'alcool est très soluble dans l'eau et donne un tétanos typique au cobaye ; l'alcool la précipite de sa solution aqueuse.

La substance active contenue dans le résidu dialyse lentement.

IMMUNITÉ.

I. — Behring et Kitasato échouent à conférer l'immunité aux animaux par l'injection de petites doses répétées de toxine tétanique : les animaux succombent au cours de l'immunisation ; ils emploient alors la méthode des inoculations combinées de toxine et de trichlorure d'iode (Voy. *Diphtérie*) et arrivent à vacciner des lapins.

II. — Brieger, Wassermann et Kitasato emploient pour la vaccination contre le tétanos la méthode de l'atténuation des cultures par le bouillon de thymus (Voy. *Diphtérie*). Une culture de tétanos en solution de peptone neutre, âgée de vingt-quatre heures et par conséquent asporulée, est mélangée à deux volumes de bouillon de thymus et injectée à doses progressives sous la peau des animaux ; cette méthode est compliquée et incertaine.

III. — Vaillard, avant le travail des auteurs précédents, était parvenu à vacciner es lapins et les cobayes en leur injectant des cul-

tures partiellement dépourvues de leur toxicité par le chauffage.

Nous reproduisons, d'après Vaillard, un exemple d'immunisation du lapin.

« A trois jours d'intervalle, on injecte dans une veine de l'oreille deux doses de 10 centimètres cubes d'une culture filtrée chauffée pendant une heure à 60^c. Cinq jours après, on injecte 10 centimètres cubes du même filtrat chauffé une heure à 55^c ; enfin, après un nouveau délai de cinq jours, on injecte 10 centimètres cubes de la culture chauffée à 50^c pendant une heure. — Dès ce moment, l'animal est immunisé ; on renforce ensuite l'état réfractaire au moyen d'injections de cultures filtrées pratiquées tous les huit ou dix jours à des doses croissantes de 5, 10, 15, 30 centimètres cubes.

IV. — Roux et Vaillard emploient actuellement de préférence pour pratiquer les inoculations vaccinales la toxine additionnée de solution iodée, procédé que nous avons déjà exposé à propos de la diphtérie.

La toxine employée est obtenue par le procédé que nous avons indiqué plus haut ; elle doit tuer une souris à la dose de 1/4000 de centimètre cube ; cette toxine est mélangée à la solution de Gram au moment de l'utilisation.

Comme exemples, nous donnons l'immunisation d'un lapin et d'un cheval.

Lapin. — Le premier jour, l'animal reçoit sous la peau 3 centimètres cubes de toxine + 1 centimètre cube de solution de Gram.

Le cinquième jour, l'animal reçoit sous la peau 5 centimètres cubes de toxine + 2 centimètres cubes de solution de Gram.

Le neuvième jour, l'animal reçoit sous la peau 12 centimètres cubes de toxine + 3 centimètres cubes de solution de Gram.

Le dix-septième jour, l'animal est immunisé ; son sérum présente la propriété antitoxique ; on peut dès lors lui donner de huit jours en huit jours, 5, 10, 15, 20, 30, 40 centimètres cubes de toxine pure ; plus tard, on rapprochera les injections et on les pratiquera dans le sang ou le péritoine ; on peut arriver à donner d'un seul coup jusqu'à 100 et 120 centimètres cubes de toxine.

Cheval. — On débute par une dose de 1 à 5 centimètres cubes d'un mélange à parties égales de toxine et de liqueur de Gram que l'on injecte sous la peau. Les injections sont répétées tous les trois ou quatre jours ; dès le quinzième jour, on arrive à 10 centimètres cubes d'un mélange de deux parties de toxine pour une de liqueur iodée ; on augmente progressivement la quantité injectée et la proportion de toxine dans le mélange. Du vingt-cinquième au trentième jour, on arrive à donner la toxine pure aux doses croissantes de 10, 15, 20 centimètres cubes, tous les deux ou trois jours ; vers le quarantième

jour, on injecte, soit sous la peau, soit dans la jugulaire, des doses croissantes de 50, 100, 150 centimètres cubes. Après les injections massives dans les viscères, le cheval peut présenter des accidents passagers tels que sueurs, coliques, diarrhée, élévation de la température de 1° à 2°. Au troisième mois, l'immunité est suffisante pour que le sérum ait un pouvoir immunisant de un million.

On peut recueillir du sang une dizaine de jours après la dernière inoculation; on maintient l'immunisation par des injections répétées tous les dix ou quinze jours de doses de 200 à 300 centimètres cubes de toxine.

V. — Vaillard a obtenu l'immunisation du lapin, en lui injectant à plusieurs reprises dans le tissu cellulaire sous-cutané de très petites doses de spores tétaniques privées de toxine et additionnées d'un peu d'acide lactique; l'animal ainsi vacciné résiste à l'inoculation de doses ordinairement mortelles de toxine tétanique, mais son sang n'a pas de pouvoir antitoxique appréciable.

SÉROTHÉRAPIE.

Behring et Kitasato ont découvert les propriétés antitoxiques du sang des animaux immunisés contre le tétanos; ils ont établi que le sang d'un lapin réfractaire au tétanos est capable de détruire les toxines sécrétées par le bacille de Nicolaïer; cette propriété existe dans le sérum débarrassé de tout élément cellulaire et se manifeste *in vitro* et dans l'organisme des animaux; elle permet ainsi le traitement des animaux auxquels on a inoculé le tétanos. La propriété antitoxique enfin manque dans le sang des animaux non réfractaires.

Vaillard a montré que le sang des animaux naturellement réfractaires, tels que la poule, ne possède pas la propriété antitoxique, mais qu'il l'acquiert facilement quand on injecte à ces animaux de la toxine tétanique : l'injection de deux à trois doses de 20 centimètres cubes de toxine dans le péritoine d'une poule confère, au bout de douze à vingt jours, des propriétés antitoxiques énergiques au sang de l'animal.

De même, le sang des lapins immunisés par injection de petites doses de spores ne possède pas de propriétés antitoxiques, mais on lui confère cette propriété en injectant aux animaux de la toxine tétanique.

De nombreux travaux de contrôle furent institués après la découverte de Behring et Kitasato; ils confirmèrent les résultats relatifs aux propriétés préventives de sérum des animaux immunisés par les

toxines; malheureusement ils mirent en doute la valeur thérapeutique du sérum (Tizzoni et Cattani, Vaillard, Rénon, etc.).

Vaillard et Roux reprennent l'étude du sérum des animaux immunisés contre le tétanos, et fixent définitivement les indications de la sérothérapie. Nous empruntons à leur mémoire la substance de l'exposé suivant :

Préparation du sérum antitoxique. — On s'adresse de préférence au sérum du cheval pour les applications de la sérothérapie aux hommes et aux animaux; pour les recherches de laboratoire, le lapin est une bonne source de sérum.

L'immunisation du cheval est pratiquée comme dans l'exemple que nous avons reproduit plus haut en suivant la même technique que pour l'immunisation contre la diphtérie. Dès le troisième mois, le cheval peut fournir du sérum; on maintient et on exalte la puissance antitoxique du sérum en injectant à intervalles de quelques jours des fortes doses de toxine dans la jugulaire ou sous la peau; après chacune de ces injections massives, la propriété antitoxique du sang diminue momentanément ; aussi faut-il attendre une dizaine de jours après l'injection pour prélever le sang.

Le sérum sera conservé avec les précautions ordinaires; il garde toutes ses propriétés quand on le soumet à la dessiccation dans le vide; on peut ainsi conserver indéfiniment et sous un petit volume du sérum très actif.

Pour évaluer l'activité du sérum, Roux et Vaillard adoptent la notation de Behring qui mesure cette activité d'après la quantité de sérum nécessaire pour immuniser un gramme de souris. Le sérum obtenu par Roux et Vaillard est actif au 10 000 000e, c'est-à-dire qu'un dixième de centimètre cube de ce sérum suffit pour immuniser 100 kilogrammes de souris, ou qu'une souris de 20 grammes est rendue réfractaire par l'injection de 2 millionièmes de centimètre cube de ce sérum.

In vitro, on mesure le pouvoir antitoxique, d'après la quantité de sérum nécessaire pour rendre inoffensif un volume donné de toxine d'activité connue.

La propriété immunisante d'un sérum croît parallèlement à la propriété antitoxique.

Le lait des animaux immunisés possède également des propriétés antitoxiques actives; l'albumine de l'œuf des poules dont le sérum a été rendu antitoxique se montre inactive.

Propriétés du sérum. — *In vitro*, le sérum des animaux immunisés mélangé à de la toxine tétanique, la rend instantanément inoffensive; la dose de sérum à ajouter à un volume donné de toxine pour

la neutraliser varie avec l'activité de ce sérum ; Roux et Vaillard ont obtenu un sérum neutralisant vingt fois son volume de toxine.

Mais, pas plus pour le tétanos que pour la diphtérie, il ne se produit *in vitro* une véritable neutralisation de la toxine par le sérum; le sérum agit sur l'organisme pour le rendre insensible à l'influence du poison (Voy. *Diphtérie*).

L'injection dans le péritoine d'un cobaye d'une dose de sérum représentant la trois cent quarante-cinquième partie du poids de l'animal confère rapidement au sang une propriété antitoxique manifeste; le sang d'un lapin qui a reçu la cent cinquantième partie de son poids de sérum possède la propriété antitoxique et un pouvoir immunisant notable.

L'injection sous-cutanée de 1 centimètre cube de sérum antitoxique pratiquée dix à quarante minutes avant l'inoculation de 1/150e de centimètre cube de toxine (dose mortelle en quarante-huit heures pour les témoins), préserve les cobayes du tétanos; mais, chez les animaux qui reçoivent la toxine moins de quarante minutes après le sérum, la prévention n'est pas complète; il se produit des symptômes tétaniques d'autant moins marqués que les animaux ont reçu le sérum plus longtemps avant le poison; cependant, la guérison survient toujours.

Il est beaucoup plus difficile de prévenir le tétanos si on intervient seulement après l'injection de la toxine pendant la période d'incubation; de même, il est moins aisé de prévenir l'affection produite par le bacille pullulant dans les tissus.

Roux et Vaillard résument ainsi leurs recherches sur la prévention du tétanos :

1° Le sérum antitoxique prévient sûrement le tétanos, même à doses extrêmement petites, lorsqu'il est injecté avant la toxine tétanique; l'immunité conférée par le sérum est passagère; elle diminue vers le quinzième jour et disparaît du quarante au cinquantième jour.

2° Lorsque le sérum est injecté en même temps que la toxine, on observe toujours un tétanos local, même quand la quantité de sérum injectée est très grande.

3° Lorsque le sérum est injecté après la toxine, mais avant l'apparition de tout symptôme tétanique, il y a toujours un tétanos local. La dose de sérum nécessaire pour empêcher la mort est d'autant plus forte que celui-ci est injecté plus tard après l'infection. Après un certain temps écoulé, variable avec les animaux, la prévention n'est plus possible, même avec de grandes quantités de sérum.

4° Le tétanos est plus ou moins rapide et par conséquent plus ou moins facile à prévenir, selon le lieu où l'injection de la toxine est

pratiquée. Les animaux inoculés à la patte résistent mieux que ceux qui ont reçu la toxine sous la peau du thorax ou de l'abdomen.

Ces conclusions s'appliquent à des doses moyennes de toxine.

5° Lorsque l'infection est produite par le bacille tétanique pullulant dans les tissus, la prévention dépend encore de la quantité de sérum injecté et du temps écoulé entre le moment de l'infection et celui de l'intervention. Elle échoue le plus souvent quand les animaux sont inoculés de façon qu'ils aient un tétanos à marche rapide. Elle peut réussir dans les infections lentes et encore, dans ces cas, la prévention n'est pas toujours définitive si on n'enlève pas le foyer. La maladie qui paraissait enrayée peut reprendre son cours et la mort survenir après des temps très longs.

Étant donnée la dernière de ces conclusions, on peut prévoir que la guérison du tétanos déclaré sera difficile à obtenir : au moment où les premiers symptômes sont constatés, la toxine a déjà agi sur les éléments cellulaires, l'antitoxine détruit le poison qu'elle rencontre dans le corps, mais elle ne peut agir sur les lésions déjà existantes. L'expérience a confirmé cette manière de voir ; les recherches de Roux et Vaillard ont montré qu'il est très difficile de guérir le tétanos déclaré chez les animaux. Des doses très fortes d'un sérum très actif ont toujours été impuissantes contre un tétanos à marche rapide ; quelques minutes après l'introduction du sérum curatif dans le péritoine, le sang des animaux traités est antitoxique et immunisant à un haut degré et cependant la maladie poursuit son cours. Le sérum prolonge la vie dans les cas de tétanos moins sévère, mais si on n'enlève pas le foyer d'infection, on n'est pas sûr que la maladie ne reprendra pas quand le pouvoir antitoxique du sang aura diminué.

Chez l'homme, la sérothérapie du tétanos n'a fourni que des résultats plus que médiocres ; cela s'explique aisément par ce fait que les malades ne se présentent au médecin que lorsque l'intoxication est réalisée, quand les contractures leur causent une véritable souffrance. Dans toutes les observations, le traitement a échoué quand il s'agissait de tétanos grave ; il a semblé réussir dans plusieurs cas où le tétanos s'annonçait comme devant être subaigu et chronique, mais on sait que ces cas se terminent souvent par la guérison quand on les traite par les moyens ordinaires.

Quoi qu'il en soit, le traitement sérothérapique est inoffensif et, s'il ne peut agir sur les lésions acquises, il peut du moins neutraliser les nouvelles quantités de poison que le bacille sécrète à chaque instant dans la plaie ; il place donc les malades dans les conditions les plus favorables à la guérison et doit toujours être tenté.

Roux et Vaillard résument ainsi la conduite à tenir dans un cas de tétanos :

« Injecter aussitôt et d'emblée une centaine de centimètres cubes de sérum très actif, exciser le foyer d'infection. Administrer encore le lendemain et le surlendemain 100 centimètres cubes de sérum par jour. Si le tétanos est enrayé, après une dizaine de jours, surtout si on n'a pas pu enlever le foyer, donner encore du sérum pour prévenir ces retours de tétanos que nous avons signalés chez les animaux. »

Les difficultés que l'on rencontre dans le traitement imposent le devoir de chercher à prévenir le tétanos, chose relativement facile. Roux et Vaillard recommandent d'injecter préventivement le sérum à la dose de 20 à 30 centimètres cubes toutes les fois qu'on est appelé à soigner une plaie contuse et souillée de terre ; les injections seraient particulièrement indiquées quand on se trouve en présence de blessures occasionnées par des flèches empoisonnées avec des boues tétanifères comme celles dont se servent les indigènes des Nouvelles-Hébrides (Le Dantec), etc.

Nocard, en médecine vétérinaire, a obtenu de forts beaux résultats en faisant des injections préventives de sérum antitétanique dans les cas de blessures du pied et après la castration : les vétérinaires qui ont adopté cette pratique ont vu le tétanos disparaître dans leur clientèle.

CHAPITRE XIII

LE BACILLE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE

L'agent de la fièvre typhoïde a été découvert par Eberth dans la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer des typhoïdiques. Gaffky a déterminé les caractères morphologiques du bacille d'Eberth.

Chez les typhoïdiques, on rencontre constamment le bacille d'Eberth dans la rate, le foie, les ganglions mésentériques et les follicules clos de l'intestin, moins fréquemment dans les poumons, les méninges, le testicule, les amygdales.

Des recherches de Chantemesse et Widal, Karlinski, etc., il résulte que le bacille d'Eberth ne passe dans les matières fécales que lorsque les ulcérations des plaques de Peyer sont établies, c'est-à-dire vers le dixième ou douzième jour de la fièvre typhoïde ; il disparaît des fèces vers la fin du troisième septénaire.

Mais, dans les fèces le bacille d'Eberth se trouve mélangé à de nombreux saprophytes ; sa recherche et son isolement sont très délicats et nécessitent l'emploi de procédés spéciaux que nous étudierons plus loin ; aussi beaucoup d'observateurs ont échoué à déceler le bacille d'Eberth dans les fèces sans qu'il soit possible de déterminer si le peu de succès de leurs recherches tient à l'absence réelle du bacille ou à l'insuffisance de leur technique.

Le bacille d'Eberth ne passe pas dans le sang, dans les conditions ordinaires; les ensemencements de quantités notables de sang typhoïdique prélevé pendant la vie ou après la mort restent stériles (Chantemesse et Widal, Besson). Fraenkel et Simmonds, dans un grand nombre d'ensemencements de sang, n'ont obtenu qu'une fois une seule colonie du bacille spécifique; dans dix-huit cas de fièvre grave compliquée d'hémorragies diverses, de suppurations, etc., des ensemencements de sang pratiqués aux différentes périodes par Besson sont toujours demeurés stériles.

Dans le sang prélevé au niveau des taches rosées, Neuhauss aurait rencontré neuf fois sur quinze le bacille d'Eberth et pour lui les taches seraient dues à des embolies bacillaires. Les résultats obtenus par Neuhauss n'ont pas été confirmés. Besson, ayant ensemencé le sang prélevé au niveau de cinquante-quatre taches rosées sur dix-neuf malades, n'a obtenu qu'une fois une culture de bacille typhique.

Le bacille d'Eberth est susceptible de passer dans l'urine des typhoïdiques (Bouchard, Leitz, Neumann). Besson a recherché le bacille d'Eberth dans les urines de trente-trois typhoïdiques : il conclut que le bacille d'Eberth apparaît dans les urines uniquement lorsque celles-ci sont

albumineuses; le bacille se rencontre dans 40 p. 100 des urines contenant de l'albumine en quantité égale ou supérieure à un gramme par litre; il disparaît de l'urine en même temps que l'albumine.

Le bacille d'Eberth se rencontre dans un grand nombre des complications survenant au cours ou pendant la convalescence de la fièvre typhoïde : c'est ainsi qu'il cause des angines (Chantemesse, Besson), le laryngo-typhus (Besson), des broncho-pneumonies et des suppurations diverses : abcès profonds, ostéites, adénites, méningites, pleurésies, péricardites, etc. (Roux et Vinay, Gilbert et Girode, Kelch, Kamen, Orloff, Ivan Honl, Besson, etc.).

Le bacille typhique a été rencontré récemment par Remlinger et Schneider dans les matières fécales d'un certain nombre de sujets (5 fois sur 10 recherches) atteints d'affections autres que la fièvre typhoïde.

Le bacille d'Eberth a été fréquemment rencontré dans les eaux et même dans des échantillons de glace destinée à l'alimentation ; sa recherche dans une eau de boisson (Voy. p. 400) est de rigueur toutes les fois qu'on se trouve en présence d'une épidémie de fièvre typhoïde. De même on a pu déceler le bacille typhique dans le sol, dans les poussières de chambrées où s'étaient produits des cas de fièvre typhoïde, etc.

On ne connaît pas d'affection spontanée causée par le bacille d'Eberth chez les animaux.

Le bacille d'Eberth présente de grandes analogies avec le bacterium coli, hôte habituel de l'intestin de l'homme et des animaux. Se basant sur ces analogies, Rodet et J. Roux (de Lyon) ont voulu identifier ces deux bacilles, mais il n'existe à l'heure actuelle aucun fait légitimant cette identification ; comme nous le verrons par la suite, le colibacille et le bacille d'Eberth possèdent des caractères propres, immuables.

FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE.

Jusqu'à ces dernières années, les inoculations aux animaux de laboratoire de cultures du bacille d'Eberth n'avaient fourni que des résultats douteux ; depuis, Sanarelli et Chantemesse et Widal ont démontré, en utilisant des virus exaltés, la réceptivité de certains animaux vis-à-vis du bacille d'Eberth; la fièvre typhoïde expérimentale ne rappelle que de très loin la maladie de l'homme; elle revêt l'allure d'une septicémie. On n'est pas arrivé à infecter les animaux par les voies digestives (1).

A. **Virus non exalté.** — Les cultures que l'on possède d'ordinaire dans les laboratoires sont le plus souvent inactives, même quand

(1) Récemment, Remlinger a déterminé une infection chez les lapins en mélangeant des cultures typhiques à leurs aliments. Ces expériences méritent confirmation.

elles proviennent de semence prise directement dans la rate des typhoïdiques; elles arrivent cependant parfois à tuer la souris et le cobaye par injection intrapéritonéale.

La souris peut succomber en vingt-quatre heures à l'inoculation intrapéritonéale d'un centimètre cube de culture récente en bouillon, le cobaye meurt parfois en quarante-huit à soixante-douze heures par septicémie à la suite de l'injection de un à deux centimètres cubes de culture dans le péritoine.

Injectées sous la peau les cultures amènent exceptionnellement la mort; le plus souvent il se forme un petit abcès au point d'inoculation et l'animal guérit rapidement.

B. **Virus exalté**. — Sanarelli et Chantemesse et Widal sont parvenus à exalter la virulence du bacille typhique; leurs virus exaltés permettent d'obtenir à coup sûr l'infection typhique chez les animaux de laboratoire.

Exaltation du virus. — 1° Sanarelli inocule dans le tissu cellulaire d'un cobaye 5 centimètres cubes d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures d'un bacille typhique inactif, en même temps qu'il injecte dans le péritoine 10 à 12 centimètres cubes d'une culture en bouillon de bacterium coli ancienne et stérilisée; le cobaye meurt en douze à vingt-quatre heures et à l'autopsie on trouve le bacille typhique en abondance dans le péritoine et parfois aussi dans la rate et le sang.

On ensemence en bouillon un peu de la sérosité péritonéale de ce premier cobaye; la culture injectée à la dose de 5 centimètres sous la peau d'un second cobaye le tue à la condition qu'on injecte en même temps dans le péritoine 7 à 8 centimètres cubes de culture stérilisée de bacterium coli. En continuant ainsi les passages on diminue par degrés la quantité de culture stérilisée de bacterium coli nécessaire pour favoriser l'infection et au bout de peu de temps on obtient un bacille capable de produire à lui seul l'infection typhique quand on l'injecte à la dose de 5 centimètres cubes dans le péritoine. Ce bacille tue rapidement le cobaye et le lapin par injection sous-cutanée à la dose de 3 à 4 centimètres cubes.

Sanarelli est arrivé aux mêmes résultats en associant au bacille typhique des cultures stérilisées de *proteus vulgaris* ou des cultures stérilisées de matières fécales ou une infusion de viande vieille d'un mois et stérilisée à 120 degrés. La simple ingestion de petites quantités de cette infusion a permis, chez le cobaye, la généralisation d'un virus typhique complètement atténué.

Dès qu'on possède un virus capable de tuer le cobaye à haute dose, on peut en achever l'exaltation par des passages successifs dans le

péritoine des cobayes. On injecte d'abord 2 à 3 centimètres cubes de sérosité péritonéale riche en bacilles; puis, à mesure que le virus s'exalte, les animaux succombant plus vite et l'exsudat péritonéal diminuant, la quantité à injecter se réduit progressivement à 0,5, 0,1 centimètre cube, et après quinze à vingt passages, il suffit d'une seule goutte pour tuer un cobaye adulte en douze à quatorze heures. A partir du trentième passage le virus ne semble plus susceptible de s'exalter davantage, il est fixé : la culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures tue les animaux sensibles à la dose de quelques gouttes dans le péritoine, mais l'inoculation sous-cutanée exige des doses plus fortes : 1 à 4 centimètres cubes pour le lapin et le cobaye, 0,05 centimètre cube pour la souris.

2° Chantemesse et Widal exaltent également la virulence d'un bacille moyennement actif par les passages successifs chez le cobaye. Pour conférer la virulence à un bacille non pathogène, ils utilisent la découverte de Vincent relative à l'exaltation du bacille d'Eberth par son association au streptocoque pyogène; ils inoculent en même temps, dans le tissu cellulaire du cobaye 4 centimètres cubes de la culture du bacille d'Eberth, et dans le péritoine 8 à 10 centimètres cubes d'une culture de streptocoque stérilisée par chauffage à 100° pendant une heure. L'animal succombe en moins de vingt-quatre heures avec généralisation du bacille d'Eberth; on pratique des passages successifs en diminuant progressivement la dose de culture stérilisée de streptocoques, et bientôt le bacille typhique est suffisamment virulent pour entraîner la mort à la dose de quelques gouttes injectées dans le péritoine.

Infection par les virus exaltés. — Le cobaye est l'animal de choix pour l'étude de l'infection typhique; nous décrirons comme type la maladie que produit chez le cobaye l'injection intrapéritonéale de quelques gouttes de virus exalté.

Deux à quatre heures après l'inoculation la température centrale s'élève et peut atteindre 40° et même 41°, mais bientôt (sixième à douzième heure) elle s'abaisse progressivement jusqu'à 36°, 35° et même 32° ; avec l'hypothermie apparaît le collapsus et l'animal succombe quinze à vingt-huit heures après l'inoculation. Pendant la période fébrile, l'animal est triste, ne mange pas; quand arrive l'hypothermie il se pelotonne dans un coin de la cage, son poil se hérisse, l'abdomen devient douloureux, le moindre attouchement provoque des cris; en même temps un amaigrissement rapide se manifeste.

A l'autopsie, la cavité péritonéale renferme une quantité variable (d'autant moins grande que le virus était plus actif) de sérosité

louche très riche en bacilles; la rate, le foie et les reins sont tuméfiés, congestionnés ; l'intestin est congestionné et contient un liquide séreux, riche en bacilles typhiques d'après Chantemesse et Widal, absolument dépourvu de bacilles typhiques et ne renfermant qu'un bacterium coli très virulent, d'après Sanarelli. Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont tuméfiés ; parfois il existe un léger épanchement dans les cavités pleurales.

Le bacille se rencontre en culture pure dans l'exsudat péritonéal et aussi dans les organes, le sang, etc. On peut constater sa présence dans les coupes des plaques de Peyer, de la rate, etc.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le bacille typhique se présente sous l'aspect de petits bâtonnets ayant en moyenne 2 à 3 μ de longueur et 0,6 à 0,7 μ de largeur; mais ces dimensions, assez constantes dans l'organisme, varient beaucoup dans les cultures. Dans le bouillon le bacille est plus grêle et plus court; dans les vieilles cultures sur gélatine il s'allonge et donne des formes filamenteuses; sur gélose et sur pomme de terre son diamètre transversal augmente aux dépens du diamètre longitudinal et il prend un aspect trapu.



Fig. 162. — Bacille typhique. — (Culture en bouillon.) — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 1/12 imm. ; Oc. II).

Les bâtonnets sont isolés ou réunis par deux; dans les jeunes cultures ils prennent fréquemment l'aspect de diplocoques.

Les extrémités du bacille typhique sont nettement arrondies; son protoplasma est homogène ; parfois cependant, et particulièrement dans les cultures anciennes, on voit, après coloration, des bacilles légèrement renflés vers le centre et présentant à ce niveau un espace clair plus ou moins étendu, c'est la *forme en navette* décrite par Artaud. La formation de cet espace clair dépend d'une dégénérescence partielle du bacille ; il faut bien savoir que cet espace ne corres-

pond pas à une spore, pas plus d'ailleurs que les renflements terminaux que l'on observe dans certaines cultures (Gaffki, Chantemesse et Widal) et qui ne sont que des formes de dégénérescence.

En règle le bacille typhique est *très mobile*, il se déplace rapidement dans le champ du microscope par des mouvements rappelant ceux du poisson dans l'eau, mais il faut savoir qu'il existe des races de bacilles typhiques qui présentent une mobilité très atténuée. Les mouvements sont dus à des cils vibratiles (Voy. plus loin).

Quand on porte avec une öse une trace d'une culture sur milieux solides dans une goutte d'eau, cette culture s'y dissocie très rapidement et la goutte d'eau louchit instantanément (Chantemesse).

Coloration. — Le bacille d'Eberth se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline; il ne prend pas le Gram. Pour la coloration des coupes et des frottis tous les procédés que nous avons indiqués à propos des microbes ne prenant pas le Gram peuvent être utilisés; nous recommandons spécialement le procédé de Nicolle au tannin (Voy. p. 215).

Coloration des cils. — Les cils du bacille d'Eberth se colorent aisément à l'aide d'une des méthodes spéciales que nous avons exposées dans la première partie de cet ouvrage (Voy. p. 151 et suivantes), mais les meilleurs résultats seront obtenus avec le procédé de Van Ermengen que nous préférons à tout autre, ou encore avec le procédé de Nicolle.



Fig. 163. — Cils du bacille d'Eberth. — Méthode de coloration de Nicolle (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Sur les préparations colorées on se rend compte aisément du nombre et de la disposition des cils vibratiles.

Chaque bacille possède en général huit à douze cils, mais il n'est pas rare de rencontrer des individus porteurs de dix-huit et même de vingt-quatre cils; dans les préparations on voit toujours des cils isolés qui ont été séparés des bacilles pendant les manipulations.

Le mode d'implantation des flagella est régulier; ils sont répartis sur toute la surface du bacille; rarement ils sont disposés en bouquets, encore cet aspect dépend-il probablement d'un phénomène d'entrai-

nement par le liquide ambiant. Souvent les bacilles apparaissent réunis en amas et agglutinés entre eux par une gangue qui présente la même coloration que les cils eux-mêmes; c'est sur cette gangue que paraissent s'implanter les cils.

La longueur des cils est variable; Remy et Sugg leur attribuent en moyenne 6 à 8 μ, mais on trouve parfois des cils beaucoup plus longs.

Les cils sont flexueux et présentent 3 à 8 ondulations.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille d'Eberth est facultativement aérobie, il cultive sur tous les milieux ordinairement employés. Il se développe à de très basses températures : la culture commence d'après Seitz à + 4°. La température optima est comprise entre 30° et 37°, mais le développement se produit jusqu'à + 46° (Rodet et G. Roux). Les cultures ne répandent aucune odeur.

Bouillon. — A 37°, dès la huitième à la douzième heure le bouillon présente un léger trouble qui s'accentue par la suite ; la culture prend alors un aspect caractéristique ; en l'examinant par transparence on voit à l'intérieur du bouillon des ondes moirées que rend apparentes une légère agitation; puis il se forme des flocons blanchâtres qui ne tardent pas à se déposer au fond du tube en y constituant un sédiment assez abondant. A la longue le liquide s'éclaircit et prend une coloration brunâtre.

Gélatine. — Le bacille typhique ne liquéfie pas la gélatine.

Piqûre. — A 18°, 20°, la culture commence dès le deuxième jour; le long de la piqûre apparaissent de petites colonies arrondies, blanc jaunâtre; à la surface il se forme un disque mince, transparent, à bords irisés, assez étendu, ou une culture épaisse, opaque, de dimensions très restreintes. La culture reste toujours grêle.

Strie sur gélatine inclinée. — Le long de la strie apparaît un voile mince, transparent, à reflets irisés, à bords irréguliers, restant grêle et cessant de s'accroître dès la fin de la première semaine. C'est là la culture classique, mais parfois il se produit le long de la strie une bandelette étroite, opaque, blanc jaunâtre et épaisse.

On note quelquefois la production dans la gélatine de cristaux allongés, simulant des arborescences et dus à la précipitation des phosphates.

Colonies isolées. — Les colonies isolées sur plaques de gélatine présentent souvent, mais non constamment, un aspect caractéristique. Vers la quarante-huitième heure, à 20°, apparaissent de petites colo-

nies circulaires qui ne tardent pas à acquérir le diamètre d'une tête d'épingle, mais restent toujours minces, de teinte blanc bleuâtre, nacrées, transparentes; bientôt les bords de chaque colonie se découpent, deviennent sinueux, en même temps qu'apparaissent des sillons et des crêtes qui parcourent la colonie de la périphérie au centre, lequel devient plus épais que les bords. Ces détails sont bien apparents quand on examine la colonie à la loupe, on a alors un aspect tout spécial que les auteurs allemands ont comparé à celui d'une montagne de glace. Les colonies atteignent au maximum les dimensions d'une lentille.

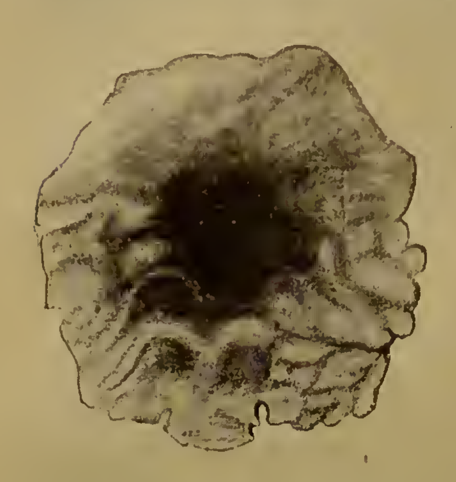


Fig. 164. — Aspect d'une colonie du bacille typhique en culture sur plaque après 5 jours. D'après une photographie 60/1.

Les colonies développées dans la profondeur de la gélatine, et même parfois celles de la surface, ont un aspect tout autre; elles restent régulièrement arrondies, deviennent opaques, transparentes et conservent les dimensions d'une tête d'épingle.

Gélose. Sérum solidifié. — La culture n'a rien de caractéristique; dès le premier jour, à 37° apparaît une strie blanchâtre qui s'épaissit par la suite et prend un aspect crémeux. La culture est plus abondante sur gélose glycérinée.

Pomme de terre. — Le plus souvent le bacille typhique donne sur pomme de terre une culture caractéristique : il ne se produit à première vue aucun développement apparent, mais en regardant à jour frisant la surface de la pomme de terre, on aperçoit le long de la strie un léger enduit humide, vernissé, rappelant le glacis de sucre que l'on met sur certains gâteaux. Fréquemment la culture reste à cet état de développement, quelquefois elle prend une légère teinte bistre.

Dans certains cas, au contraire, il se produit à la surface de la pomme de terre une couche bien visible d'aspect jaunâtre ; quelquefois même la strie peut être franchement brunâtre. D'après Buchner ces formes de cultures s'obtiendraient à volonté en alcalinisant au préalable les pommes de terre dans une solution de carbonate de soude.

Milieu de Remy et Sugg. — Pour obvier aux inconvénients liés aux variations de la composition chimique de la pomme de terre, Remy et Sugg ont proposé un milieu artificiel dans lequel entrent les

substances constituant la pomme de terre. Sur ce milieu le bacille d'Eberth donne constamment, d'après ces auteurs, une culture caractéristique : « un enduit limité, festonné, absolument incolore ».

On obtiendra de la manière suivante le milieu de Remy et Sugg :

1° Préparer d'abord une solution :

Eau	1000 centimètres cubes.
Glycose	20 grammes.
Peptone	5 —
Asparagine	5 —
Acide citrique	0,75 —
Phosphate neutre de potassium	5 —
Sulfate de magnésium	2,50 —
Sulfate de potassium	2,50 —
Chlorure de sodium	1,25 —

Alcaliniser légèrement avec du carbonate de sodium.

2° A 100 centimètres cubes de la solution obtenue, ajouter :

Gélatine extra	10 grammes.
Magnésie calcinée	2 —

Répartir en tubes, stériliser, incliner les tubes pendant le refroidissement; pratiquer les ensemencements en strie.

Lait. — Le bacille typhique se développe dans le lait sans jamais le coaguler.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Les difficultés du diagnostic du bacille d'Eberth et de la différenciation de ce bacille et du bacterium coli ont rendu nécessaire l'étude approfondie de ses propriétés biologiques, les caractères morphologiques ne pouvant fournir à eux seuls des bases solides pour la détermination.

Variabilité des cils. — Remy et Sugg ont montré que l'action de la lumière solaire, des antiseptiques à petites doses, et des températures dysgénésiques était à peu près sans influence sur le nombre et la forme des cils.

La variabilité morphologique en ce qui concerne les cils est donc au moins très limitée; c'est là une constatation importante en raison de ses applications au diagnostic du bacille typhique.

Action sur les sucres. — Le bacille typhique attaque sensiblement la glycose, a une faible action sur la lévulose et la galactose, mais ne fait pas fermenter les saccharoses et la lactose. Il n'exerce également aucune action fermentative vis-à-vis de la mannite.

Ces propriétés du bacille typhique, mises en lumière de la manière suivante, fourniront des données précieuses pour le diagnostic :

a. *Ensemencement dans un tube de bouillon lactosé additionné d'un peu de carbonate de chaux* (Voy. p. 32) : il ne se dégage jamais de bulles de gaz quelle que soit la durée du séjour à l'étuve.

b. *Ensemencement sur gélatine lactosée ou mannitée additionnée de tournesol* (Voy. p. 55) : les colonies du bacille d'Eberth n'attaquant pas la lactose, il n'y a pas production d'acides et la gélatine garde sa teinte bleue.

c. *Ensemencement dans le lait :* il ne se produit pas de coagulation ; si on a ajouté au lait de la teinture de tournesol, celle-ci garde sa teinte bleue.

d. *Ensemencement dans le petit-lait :* la lactose n'est pas attaquée ; il peut se produire une très légère acidité de milieu, mais en aucun cas cette acidité ne dépasse 3 p. 100 de solution décinormale de soude.

Nous verrons que dans les mêmes conditions le bacille coli produit des réactions tout autres ; il est important de remarquer que pour l'établissement du diagnostic les milieux fermentescibles ne doivent jamais être à base de glucose, cette substance fermentant légèrement sous l'influence du bacille d'Eberth.

Absence de production d'indol. — Le bacille typhique ne produit jamais d'indol dans les cultures.

Recherche de l'indol. — Pour rechercher l'indol il faut ensemencer le microbe à étudier dans une solution de peptone, de préférence au bouillon ordinaire ; on utilise la solution suivante :

Eau	100 centimètres cubes.
Peptone Witte ou Chapoteau	3 grammes.
Chlorure de sodium	0,5 à 1 gramme.

Répartir en tubes à raison d'environ 15 centimètres cubes par tube et stériliser à l'autoclave.

Au bout de deux à huit jours la culture devra être soumise à une des épreuves suivantes :

a) Ajouter à un tube de culture en solution de peptone, 1 centimètre cube d'une solution de nitrite de potassium à 0,02 p. 100, puis lentement, 1 centimètre cube d'acide sulfurique chimiquement pur dilué au quart. Si la culture contient de l'indol, il se produit une teinte rose (Réaction de Salkowski).

b) Ajouter au tube de culture V à X gouttes d'une solution de nitro-prussiate de soude à 5 p. 100, puis quelques gouttes de lessive de soude à 30 p. 100 : il se produit une coloration brune ; au bout de

quelques instants, faire tomber dans le tube X à XV gouttes d'acide acétique cristallisable : si la culture contient de l'indol il se développe une teinte bleue caractéristique; la teinte bleue n'apparaît souvent qu'au bout d'un certain temps (Réaction de Weyl-Legal).

c) Ajouter au tube de culture quelques gouttes d'acide acétique cristallisable, puis 2 à 3 centimètres cubes d'alcool-éther; agiter, puis laisser reposer et décanter l'éther que l'on fait évaporer dans une petite capsule de porcelaine. Après évaporation ajouter au résidu I à II gouttes de la solution de nitrite de potassium à 0,02 p. 100 et quelques gouttes d'acide sulfurique pur. Ce procédé est très sensible, la moindre trace d'indol se révèle par une teinte rosée (Réaction de Nencki).

Culture en milieux minéraux. — Nœgeli, Laurent, Beyerinck, Péré, Maasse, etc., ont donné la formule d'un certain nombre de milieux minéraux sur lesquels le développement du bacille d'Eberth est tardif et insignifiant, tandis que les bactéries voisines avec lesquelles on est exposé à le confondre y cultivent abondamment. Il ne convient pas d'attacher une trop grande importance à ce caractère, mais il a cependant une constance suffisante pour que le développement nul ou tardif dans un des milieux indiqués par Nœgeli, Maasse, etc., constitue un bon signe d'identification du bacille d'Eberth. On utilisera de préférence le milieu suivant (Remy et Sugg):

Eau distillée	100 grammes.
Glycose	20 —
Nitrate de sodium	10 —
Phosphate neutre de potassium	1 gramme.
Sulfate de magnésium	2 grammes.
Chlorure de calcium	1 gramme.

Inaptitude au développement sur les milieux vaccinés. — Chantemesse et Widal ont mis en lumière une propriété curieuse du bacille typhique : si on racle avec une öse la surface d'une culture de ce bacille sur gélatine ou gélose, de manière à débarrasser le milieu de culture des colonies qui le recouvraient, les ensemencements pratiqués sur ce milieu avec du bacille nouveau ne donnent lieu à aucun développement, la gélatine ou la gélose restent stériles, elles ont été « *comme vaccinées* » par la première culture. Malheureusement ce phénomène manque parfois et ne saurait constituer à lui seul un élément certain de diagnostic.

Cultures sur milieux colorés. — D'Abundo, Nœggerath, Gasser ont insisté sur la propriété que possède le bacille typhique de décolorer en se développant les milieux additionnés de certaines matières colorantes.

Le milieu de Nœggerath, dont nous avons donné la formule page 55, a été recommandé par son auteur, puis par Deschamps et Grancher pour la diagnose du bacille typhique : sur les plaques de gélatine colorée par le liquide de Nœggerath le bacille typhique ensemencé en strie donne une culture violet évêque, tandis que le milieu se décolore aux alentours.

Gasser a reconnu que le milieu de Nœggerath donne des résultats incertains et a proposé de le remplacer par la gélose fuchsinée (Voy. p. 56) : sur cette gélose à 37°-39°, au bout de deux jours, la culture du bacille d'Eberth a pris une teinte rouge, tandis que le milieu s'est décoloré.

Ainsi que l'ont montré Holz, Dunbar, Remy et Sugg, etc., les résultats fournis par ces cultures ne sont pas constants et ne peuvent servir à caractériser le bacille typhique.

Vitalité. — Le bacille typhique, pris dans les cultures, succombe quand on l'expose à une température de + 60° pendant dix à vingt minutes ; il résiste à des températures très basses ; Prudden l'a retrouvé vivant dans un bloc de glace maintenu pendant trois mois entre — 1 et — 11 ; mais les alternatives de congélation et de liquéfaction le tuent rapidement.

Dans l'eau le bacille typhique conserve longtemps sa vitalité (Straus et Dubarry, Chantemesse et Widal) ; dans l'eau stérile on peut le retrouver vivant au bout de trois mois ; quand l'eau contient des microbes saprophytes la disparition du bacille typhique est plus rapide, mais on peut encore le retrouver après un mois (Hueppe).

Dans le sol le bacille peut rester vivant pendant cinq mois et demi (Grancher et Deschamps).

L'action de la lumière tue rapidement le bacille typhique (Gaillard, Janowsky) : des cultures exposées au soleil, au mois de mai, ont été trouvées stériles au bout de quatre à huit heures.

Virulence. — A propos de la fièvre typhoïde expérimentale nous avons insisté sur la grande variabilité de la virulence du bacille d'Eberth et nous avons exposé les moyens qui permettent d'exalter cette virulence.

RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'ORGANISME.

On recherche le bacille typhique dans l'organisme des malades atteints de fièvre typhoïde et le cadavre des individus ou animaux ayant succombé à l'infection ; mais fréquemment aussi on doit le rechercher dans les eaux, les poussières, les matières fécales, etc.

Ces deux sortes de recherches sont très différentes ; quand le bacille typhique se trouve à l'état pur dans une humeur, un organe, la recherche en est aisée ; il en est tout autrement quand le bacille typhique est associé à d'autres germes et particulièrement au bacterium coli.

Nous étudierons dans un chapitre spécial les procédés de recherche du bacille typhique dans l'eau, les fèces, etc. (Voy. p. 400); pour le moment nous ne devons envisager que le cas le plus simple, celui où le bacille typhique est présumé exister à l'état pur dans une humeur ou un organe.

Examen microscopique. — Ne permet en aucun cas de poser un diagnostic ferme.

1° Préparer des lamelles avec le pus, le sang, etc., des frottis avec la pulpe des organes. Colorer au bleu de méthylène ou à la thionine. Faire l'épreuve du Gram qui devra rester négative.

2° Les organes à couper sont fixés à l'alcool absolu ou au sublimé acide et inclus dans la paraffine. Les coupes sont colorées de préférence par le procédé de Nicolle au tanin (Voy. p. 215).

Cultures. — Ensemencer un peu de l'organe ou de l'humeur en bouillon et sur gélose.

On fera subir aux cultures toutes les épreuves que nous indiquons p. 400 pour identifier le bacille typhique.

LA TOXINE TYPHIQUE

I. — Brieger a recherché le premier la présence de substances toxiques dans les cultures du bacille d'Eberth ; il en a extrait une ptomaïne (typhotoxine) possédant des propriétés toxiques énergiques. On sait aujourd'hui que les ptomaïnes de Brieger ne sont que des produits de décomposition des substances albuminoïdes sous l'influence des traitements chimiques que cet auteur faisait subir aux cultures.

II. — Brieger et Fraenkel filtrent des cultures de bacille typhique, les concentrent dans le vide au tiers de leur volume, puis les précipitent par 10 fois leur volume d'alcool acidulé par quelques gouttes d'acide acétique. Le précipité obtenu est dissous dans l'eau ; la dissolution est saturée de sulfate d'ammoniaque et soumise à la dialyse ; il reste sur le dialyseur une substance albuminoïde assez faiblement toxique, active surtout vis-à-vis du lapin qu'elle tue en quelques jours sans lésions appréciables.

III. — Dans les recherches récentes on a renoncé à isoler des cultures typhiques un produit chimiquement déterminé et on s'est

contenté d'étudier la toxine brute telle qu'on la rencontre dans les bouillons où on a cultivé le bacille d'Eberth ; les recherches conduites dans cette voie par Sanarelli ont été fécondes.

Sanarelli utilise pour la préparation de la toxine le virus exalté par les passages successifs dans le péritoine des cobayes (Voy. p. 369). Le bacille est ensemencé dans du bouillon glycériné à 2 p. 100 ; la culture est maintenue à l'étuve à 37° pendant un mois, puis on la stérilise par le chauffage et on la laisse en repos pendant huit mois à la température ordinaire ; au bout de ce temps le ballon qui contient la culture est scellé à la lampe et porté pendant quelques jours à +60°. Pendant ces longues macérations la toxine contenue dans le corps des microbes diffuse dans le liquide de culture ; ce liquide décanté avec soin constitue la toxine de Sanarelli.

Action sur les animaux. — *Lapin.* — Cette toxine, injectée sous la peau, tue le lapin de 700 à 1000 grammes à la dose de 10 centimètres cubes par kilogramme d'animal ; peu après l'injection la respiration devient plus fréquente, puis l'animal chancelle, une parésie générale se manifeste progressivement et vers la sixième ou douzième heure surviennent des accès convulsifs qui aboutissent à la mort.

La température, qui au début s'était élevée de 1/10 de degré environ, ne tarde pas à s'abaisser au-dessous de la normale ; la mort survient en hypothermie. Les effets de la toxine varient d'un animal à l'autre, souvent la mort ne survient qu'au bout de quelques jours et est précédée d'une période cachectique (amaigrissement, diarrhée, etc.). — A l'autopsie on trouve de l'anémie des organes abdominaux ; il n'existe ni congestion de la muqueuse intestinale, ni tuméfaction des plaques de Peyer.

Souris. — La souris succombe d'ordinaire à l'injection sous-cutanée de 1 centimètre cube de toxine ; la mort arrive en quelques heures ; à l'autopsie on constate une légère hyperhémie des viscères abdominaux, de la tuméfaction de la rate et un léger épanchement stérile dans le péritoine. — L'inoculation intrapéritonéale est beaucoup plus grave ; la dose mortelle minima est alors de 0,2 centimètre cube.

Cobaye. — Le cobaye est un excellent réactif pour la toxine typhique ; la dose mortelle minima est de 1,5 centimètre cube par 100 grammes du poids du corps, par la voie sous-cutanée. L'inoculation intrapéritonéale est moins sûre.

L'inoculation sous-cutanée de 4 à 5 centimètres cubes de toxine par 100 grammes du poids de l'animal amène la mort du cobaye en 15 à 20 heures. Dès le moment de l'injection la température s'abaisse progressivement jusqu'à la mort ; environ une heure après

l'injection apparait une forte météorisation abdominale accompagnée d'une vive sensibilité douloureuse : l'animal se tient immobile, ramassé sur lui-même, il pousse des cris dès qu'on le touche ; au bout de quatre à cinq heures, il est accablé, tient les yeux mi-clos et est en proie à un tremblement presque continuel ; le ventre est météorisé, très sensible ; il peut se produire de la diarrhée parfois hémorragique ; enfin apparait la paralysie, le météorisme disparaît et la mort survient.

A l'autopsie, on trouve dans la cavité péritonéale une quantité plus ou moins grande d'un exsudat riche en leucocytes et souvent trouble ; la rate est tuméfiée, congestionnée, friable ; les parois de l'intestin grêle sont dilatées, amincies et complètement infiltrées de sang ; la surface de la muqueuse est rouge et les plaques lymphatiques sont infiltrées et congestionnées. L'estomac, les capsules surrénales sont le siège de congestions intenses et de taches ecchymotiques ; l'intestin est rempli par un liquide diarrhéique contenant en culture pure du bacterium coli très virulent.

Singe. — Le singe est extrêmement sensible à la toxine typhique ; la marche et les lésions de l'intoxication sont les mêmes que chez le cobaye.

IV. — Chantemesse a obtenu une toxine plus active en cultivant le bacille exalté dans un milieu préparé avec la rate ou le sang ; d'après les recherches de cet auteur, le maximum de toxicité des cultures est atteint le cinquième jour à 37°, puis l'activité de la toxine baisse rapidement.

IMMUNITÉ.

I. — Beumer et Peipper arrivent à immuniser des souris blanches en leur inoculant à plusieurs reprises pendant plusieurs jours de suite des doses croissantes de cultures vivantes.

II. — Brieger, Wassermann et Kitasato appliquent à l'immunisation contre le bacille d'Eberth leur procédé d'atténuation des germes par les cultures en bouillon de thymus (Voy. p. 31 et 340). Des cultures d'un bacille virulent faites dans le bouillon de thymus et chauffées à 60° vaccinent le cobaye et la souris contre la fièvre typhoïde expérimentale.

III. — Brieger, Wassermann et Kitasato obtiennent encore l'immunisation du cobaye par un autre procédé ; des cultures virulentes sont chauffées à 80-90°, évaporées au dixième et précipitées par l'alcool. Le précipité obtenu est desséché dans le vide ; inoculé au cobaye à la dose de 2 centigrammes, il lui confère l'immu-

nité. Chantemesse et Widal ont trouvé cette méthode fort infidèle.

IV. — Sanarelli et Chantemesse et Widal confèrent l'immunité aux animaux en leur injectant des cultures stérilisés par la chaleur.

1° Sanarelli cultive le bacille exaltéen bouillon peptonisé ; après un séjour de 8 à 10 jours à 37° les cultures sont stérilisées à 120°. Les cultures ainsi traitées possèdent des propriétés vaccinantes.

En général, pour immuniser des cobayes de 400 grammes, il suffit de leur injecter 16 à 18 centimètres cubes de cultures stérilisées, en plusieurs fois pendant une période de cinq jours ; l'immunité est acquise à partir du quatrième jour après la dernière injection et les cobayes résistent aux inoculations de virus exalté. Pendant la durée de l'immunisation les animaux présentent un certain amaigrissement, mais ils reviennent ensuite rapidement à l'état normal.

Le lapin est beaucoup plus sensible que le cobaye : l'immunisation en est très laborieuse et la mort survient souvent au cours du traitement ; les animaux qui survivent se montrent solidement immunisés.

2° Chantemesse et Widal utilisent une culture en bouillon laissée à 37° pendant quinze jours et stérilisée à 100°. Seize à vingt centimètres cubes sont nécessaires pour immuniser le cobaye ; il convient de les injecter en quatre doses en mettant quelques jours entre chaque injection. La durée totale de l'immunisation est de quinze jours, puis au bout de huit jours on peut pratiquer l'inoculation d'épreuve (2cc de culture virulente dans le péritoine.) Assez souvent les animaux succombent au cours de l'immunisation ou lors de l'inoculation d'épreuve.

L'immunisation du lapin se pratique de la même façon, mais est encore plus délicate.

Chantemesse a réussi à immuniser le cheval en lui injectant des quantités croissantes de toxine active obtenue par le procédé décrit plus haut.

SÉROTHÉRAPIE.

Brieger, Wassermann et Kitasato ont montré que l'on peut immuniser les souris contre l'infection typhique expérimentale en leur injectant du sérum prélevé chez un animal vacciné. Sanarelli et Chantemesse et Widal ont poursuivi l'étude de la sérothérapie de la fièvre typhoïde.

Le sang des lapins et des cobayes immunisés, recueilli quelques jours après l'inoculation d'épreuve, donne un sérum doué de propriétés préventives et curatives. L'inoculation dans le péritoine

ou sous la peau du cobaye d'une dose mortelle de culture typhique mélangée à 0cc,5 de ce sérum reste absolument inoffensive.

Le cobaye est immunisé en quelques heures par une injection de 2 centimètres cubes du sérum d'un animal vacciné, il résiste alors à l'inoculation de doses sûrement mortelles de virus typhique exalté.

De même on peut sauver les animaux inoculés avec une dose mortelle de culture en leur injectant dans les trois heures qui suivent l'inoculation une dose de 1 à 2 centimètres cubes de sérum antityphique.

Le sérum du cheval immunisé par Chantemesse et Widal, injecté au cobaye à la dose de 1/50e de goutte vingt-quatre heures avant l'inoculation d'une dose mortelle de virus, le protège contre l'infection typhique.

Chantemesse et Widal ont montré que le sérum provenant d'hommes atteints, convalescents ou guéris de la fièvre typhoïde possède des propriétés préventives et curatives, susceptibles de persister plusieurs années après la guérison de la maladie. Pour manifester ces propriétés, ce sérum doit être injecté à des doses plus fortes que le sérum des animaux immunisés (2 à 10cc) ; le sérum d'hommes n'ayant jamais eu la fièvre typhoïde ne possède pas ces propriétés (sauf une exception citée par Chantemesse et Widal).

On a tenté chez l'homme le traitement de la fièvre typhoïde au moyen du sérum d'animaux immunisés ou de typhoïdiques guéris ou en convalescence (Cesaris-Demel, Orlandi, Börger, Chantemesse et Widal, etc.). Les résultats obtenus sont favorables, mais non encore décisifs.

Sanarelli a montré que le sérum antityphique ne possédait aucune propriété bactéricide ni antitoxique. Mais ce sérum possède par contre une propriété remarquable, mise en lumière par Durham et Grüber et étudiée par Widal : la *propriété agglutinante*. — Quand on ajoute à une culture récente de bacille typhique en bouillon une petite quantité de sérum provenant d'un animal immunisé ou d'un homme atteint ou guéri de fièvre typhoïde (Widal), les bacilles épars dans le bouillon perdent leur mobilité, se groupent en amas, s'agglutinent en petits paquets, tout en conservant d'ailleurs leur vitalité. — Chez le typhoïdique la propriété agglutinante se rencontre encore dans la sérosité des vésicatoires, le lait, les larmes (non provoquées) et moins fréquemment dans l'urine, le pus, la bile, etc. (Widal).

Widal a utilisé la présence de la propriété agglutinante dans le sang des typhoïdiques pour établir un procédé rapide et certain de diagnostic de la fièvre typhoïde : le *séro-diagnostic*.

SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE.

La propriété agglutinante apparaît dans le sang des typhoïdiques d'ordinaire dès les premiers jours de la maladie; assez souvent cette apparition est retardée ; elle ne manque que par exception (une fois sur 163 cas de Widal et Sicard, une fois sur 39 cas que nous avons observés).

Une réaction positive obtenue selon les règles que nous allons indiquer constitue un signe de certitude de la fièvre typhoïde; un résultat négatif obtenu avec le sang d'un malade suspect fournit seulement une probabilité contre le diagnostic de fièvre typhoïde, surtout si la recherche a été pratiquée pendant les premiers jours de la maladie; l'examen doit alors être répété les jours suivants; la probabilité est d'autant plus grande que l'examen a été fait à une période plus avancée de la maladie.

La réaction agglutinante peut être mise en évidence par plusieurs procédés *lents* ou *rapides*, mais quel que soit le procédé employé on devra toujours se conformer aux règles suivantes :

1° Le sang destiné à l'examen est recueilli purement soit par ponction d'une veine du pli du coude (p. 190), soit plus simplement par piqûre de la pulpe du doigt à la lancette : on aseptise la région, on la dessèche (p. 189), on pique avec la pointe d'une lancette flambée et on recueille le sang (dont on facilite l'issue par un massage pratiqué de la racine du doigt jusqu'au voisinage de la piqûre) dans un petit tube de verre stérilisé.

2° Pour les examens à distance le sang peut être envoyé dans le tube de verre où on l'a recueilli, bouché avec un bouchon flambé; mais, la dessiccation n'altérant pas la propriété agglutinante dans le sang, il est quelquefois plus simple, pour les envois à un laboratoire éloigné, de recueillir quelques gouttes de sang sur un morceau de papier ou une lame de verre et de l'y laisser dessécher. Pour utiliser le sang desséché, on le dissout dans une ou deux gouttes d'eau. Nous avons eu maintes fois l'occasion d'examiner des gouttes de sang desséchées envoyées au laboratoire que nous dirigeons de différentes garnisons de Bretagne et nous avons toujours obtenu de fort bons résultats. Le sang desséché sur lame de verre nous a toujours paru plus actif que celui qui était desséché sur papier.

3° Au moment de l'usage il faut toujours s'assurer par un examen microscopique que la culture que l'on emploie pour le séro-diagnostic est pure : on conçoit les erreurs qui pourraient résulter de l'usage d'une culture impure.

I. **Procédé lent.** — Ce procédé exige l'emploi d'un sérum rigoureusement pur : le sang recueilli par ponction d'une veine du pli du coude est abandonné au repos dans un tube stérile jusqu'à séparation du caillot, puis on aspire le sérum dans une pipette Pasteur.

a) A un tube contenant 6 à 10 centimètres cubes de bouillon stérile on ajoute une dizaine de gouttes du sérum à examiner et on ensemence avec une trace d'une culture typhique ; on a toujours soin d'ensemencer en même temps, comme témoin, un tube de bouillon simple ; les tubes sont placés à l'étuve à 37°. — On note un léger retard de la culture dans le tube additionné de sérum, puis au bout d'une huitaine d'heures on y voit apparaître de légers grumeaux ; vers la dix-huitième heure l'aspect devient caractéristique : les microbes sont réunis au fond du tube en petits flocons blanchâtres et le bouillon reste absolument clair ; les grumeaux ne se laissent pas dissocier par agitation du tube. Au contraire, dans le tube témoin le bouillon est trouble et présente les ondes miroitantes caractéristiques de la culture du bacille d'Eberth.

La réaction n'est pas toujours aussi nette : parfois le bouillon au lieu de rester clair présente un trouble irrégulier, sans ondes, et dû à la précipitation d'une très fine poussière dont chaque grain, examiné au microscope, est une agglomération de microbes. Quelquefois aussi la réaction est d'abord caractéristique, puis, au bout de dix-huit à vingt-quatre heures, le bouillon se trouble au-dessus du précipité. L'examen à l'œil nu doit donc toujours être complété par l'examen microscopique qui décèle les amas de petites dimensions et permet de reconnaître la structure de ces amas.

b) On peut encore ajouter le sérum à une culture typhique en bouillon âgée de vingt-quatre à trente-six heures ; le mélange est placé à l'étuve à 37°. Quand la propriété agglutinante du sérum est considérable, au bout de quelques heures la culture devient grumeleuse et s'éclaircit rapidement en même temps que se précipitent au fond du tube les amas bacillaires ; quand le sérum est peu actif, il se forme des grumeaux, mais la clarification n'est jamais complète. Toujours il est nécessaire de confirmer par l'examen microscopique les observations faites à l'œil nu.

II. **Procédé extemporané.** — Ce procédé est le plus rapide et le plus sensible ; de plus il n'exige que quelques gouttes de sang recueilli par piqûre du doigt. C'est donc à lui que l'on devra s'adresser dans la plupart des cas.

Le procédé extemporané exige l'emploi d'une culture âgée de un à deux jours. Le plus grand soin doit être apporté dans le choix de cette culture ; il est, bien entendu, essentiel qu'elle soit pure et il

est indispensable qu'elle soit récente, car il se forme rapidement dans les cultures anciennes de faux amas qui fausseraient les résultats de l'opération. Ces faux amas existent parfois même dans les cultures âgées de vingt-quatre heures : *il est nécessaire de toujours examiner au microscope la culture au moment même de l'employer.* On rejettera toute culture dans laquelle il existerait des amas de bacilles. Pour se mettre à l'abri de toute cause d'erreur, on aspire dans une pipette Pasteur une quantité suffisante de culture pour pratiquer la recherche, on porte une trace du contenu de la pipette sur une lame et on l'examine au microscope ; le reste du contenu de la pipette sert immédiatement à faire le séro-diagnostic.

On peut utiliser pour le séro-diagnostic le sang total, mais ce procédé plus rapide en apparence ne l'est pas en réalité, car il faut attendre avant de pratiquer l'examen microscopique que les globules rouges se soient déposés au fond du vase contenant le mélange de sang et de culture.

On conduira la recherche de la façon suivante :

A. — Dans un petit verre conique on fait tomber XX gouttes de la culture du bacille d'Eberth et on y ajoute 1 goutte du sérum à éprouver. On porte de suite une goutte du mélange sur une lame, on recouvre d'une lamelle et on examine avec l'objectif 8 ou 9 ; quand le sérum possède la propriété agglutinante on voit d'ordinaire de suite des amas de bacilles agglutinés et, entre ces amas, des bacilles libres plus ou moins nombreux. Mais la réaction est encore plus nette si on examine la préparation au bout de quinze à vingt minutes : on aperçoit de nombreux îlots compacts formés par les bacilles agglomérés. L'aspect est caractéristique et rend toute erreur impossible. — L'agglutination est favorisée par une légère dessiccation de la périphérie de la goutte entre la lame et la lamelle ; elle est beaucoup plus nette au bout de quelques minutes et dans les cas où le sérum ne possède qu'une activité minime elle peut n'apparaître qu'après quarante à soixante minutes.

B. — *Réaction avec le sang desséché.* — Le sang desséché, comme nous l'avons dit plus haut, est dissous au moment de l'emploi dans une ou deux gouttes d'eau stérile. Au liquide obtenu on ajoute VIII à X gouttes de la culture du bacille d'Eberth. On laisse reposer un instant pour permettre la séparation des globules rouges qui gêneraient l'observation et on pratique l'examen comme dans le cas précédent.

C. — *Réaction avec le bacille mort.* — Le phénomène de l'agglutination n'est pas lié à une réaction vitale des bacilles : il apparaît quand on fait usage de cultures tuées. De ce fait on peut tirer une

application utile au séro-diagnostic : on n'a pas toujours sous la main une culture récente de bacilles typhiques; avant de pratiquer l'examen il faut réensemencer une culture ancienne et perdre par conséquent une douzaine d'heures; cet inconvénient est surtout notable dans les laboratoires où l'on est exposé à recevoir du sang de malades éloignés et pour lesquels il y a intérêt à établir un diagnostic rapide. Aussi a-t-on tout avantage à se servir d'une culture tuée, l'expérience ayant montré qu'une telle culture garde pendant plusieurs semaines sa sensibilité vis-à-vis du sérum agglutinant. Le procédé suivant est à recommander (Widal et Sicard) :

A une culture typhique âgée de seize à vingt-quatre heures et ayant subi l'épreuve de l'examen microscopique on ajoute un peu de formol du commerce (à raison de II gouttes de formol pour 15^{cc} de culture); les bacilles sont tués, restent « comme embaumés » et gardent intégralement pendant plusieurs semaines l'aptitude à l'agglutination. On a soin de couvrir le tampon d'ouate du tube contenant la culture avec un capuchon d'ouate; on peut ainsi conserver au laboratoire des cultures tuées de la même façon que l'on garde un réactif chimique. Au moment du besoin on agite légèrement le tube pour répartir uniformément les microbes dans le bouillon et on mêle à X gouttes de cette culture morte une goutte de sérum, en opérant comme il a été dit plus haut.

Mensuration du pouvoir agglutinatif. — Le pouvoir agglutinatif existe à un degré variable dans le sérum des typhoïdiques; tantôt il est très faible, tantôt au contraire il est tellement énergique que la formation des amas se produit encore dans les dilutions supérieures à 1/5000e et à 1/12000e.

La recherche de la propriété agglutinante devra toujours commencer par l'examen de la dilution au dixième; au-dessous de cette dilution la constatation de l'agglutination laisserait place au doute (Voir *Bacterium coli*); mais il ne suffit pas de faire cette seule épreuve : on devra, dans tous les cas, mesurer plus exactement l'intensité du pouvoir agglutinatif en le recherchant dans des dilutions au 1/20e, au 1/30e, etc.

En pratique, quand on dispose d'une faible quantité de sang, on pourra se contenter de deux épreuves, l'une avec le mélange au dixième, l'autre avec une dilution au cinquantième.

Widal et Sicard distinguent :

Le pouvoir agglutinatif très faible................	Inférieur à 1/100.
— faible................	De 1/100 à 1/200.
— moyen............	De 1/200 à 1/500.
— intense............	De 1/500 à 1/2000.
— très intense.........	Supérieur à 1/2000.

Dans ces mensurations il importe que les gouttes de culture et de sérum mélangées soient égales entre elles ; on obtient une précision suffisante par le procédé suivant : On prend un tube de verre d'environ 20 centimètres de long et on en bouche les deux extrémités à l'ouate ; on étire la partie moyenne à la lampe, comme pour la préparation des pipettes de Pasteur, mais sans séparer les deux pipettes obtenues ; on stérilise le tube ainsi préparé et au moment du besoin on casse la partie effilée à sa partie moyenne : on obtient ainsi deux pipettes donnant des gouttes sensiblement égales, l'une sert pour la culture, l'autre pour le sérum.

Au point de vue du pronostic il ne semble point que l'intensité du pouvoir agglutinatif puisse fournir des renseignements certains sur la gravité de l'affection ; parfois ce pouvoir est très marqué dans les cas de fièvre sévère, mais ce n'est pas là un fait constant.

LE BACILLE DE LA PSITTACOSE.

L'étude du bacille de la psittacose doit être rapprochée de celle du bacille d'Eberth : ces deux microbes présentent entre eux les plus grandes analogies.

On désigne sous le nom de *psittacose* une maladie infectieuse des perruches et des perroquets, transmissible à l'homme. Nocard a étudié et décrit l'agent de cette maladie.

La psittacose est transmise de l'animal à l'homme, soit par le gavage de bouche à bec, soit par le contact des plumes de l'animal souillées par les déjections, ou des cages ayant contenu des perruches malades. La maladie est transmissible de l'homme à l'homme.

Le bacille de la psittacose se rencontre dans la moelle osseuse et le sang des perruches malades (Nocard). On ne l'a trouvé encore qu'une seule fois chez l'homme ayant succombé à la psittacose (Gilbert et Fournier), il existait en culture pure dans le sang du cœur. Jamais il n'a été rencontré dans les crachats, l'urine, le sang, les sérosités, chez les sujets vivants.

D'autre part, Achard et Bensaude ont rencontré le bacille de Nocard chez deux sujets atteints d'affections autres que la psittacose (abcès sterno-claviculaire, cystite purulente) et Gilbert et Fournier ont isolé du contenu intestinal de perruches bien portantes un microbe analogue à celui de Nocard.

En présence de ces faits, on peut encore émettre quelques doutes sur la spécificité du bacille de Nocard, particulièrement en ce qui concerne l'affection humaine.

PSITTACOSE EXPÉRIMENTALE.

Les perroquets et les perruches sont très sensibles au bacille de Nocard ; ils succombent en quelques jours à l'inoculation, après avoir présenté les symptômes suivants : l'animal se tient immobile, ramassé sur lui-même, les plumes hérissées, les ailes pendantes, il ne mange pas, est en état de somnolence continuelle et est atteint de diarrhée.

Il en est de même de la souris, du lapin et du pigeon ; le cobaye est beaucoup plus résistant.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Aspect microscopique. — Le bacille de Nocard est morphologiquement analogue au bacille d'Eberth ; c'est un petit bâtonnet à bouts arrondis, très mobile, possédant 10 à 12 cils ; on ne lui connaît pas de spores.

Il se colore aisément par les couleurs basiques, mais ne prend pas le Gram.

Cultures. — Les conditions de culture sont les mêmes que celles du bacille d'Eberth ; les caractères des cultures sont très analogues pour les deux bacilles.

Bouillon. — A 37°, trouble très rapide, abondant, avec formation d'une très légère pellicule à la surface.

Gélatine. — Cultures un peu plus abondantes que celles du bacille d'Eberth, très analogues à celles du bacterium coli.

Gélose. — Mêmes caractères que le bacille typhique.

Pomme de terre. — Culture ordinairement épaisse, brunâtre, analogue à celle du bacterium coli type.

Lait. — Pas de coagulation.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

Le bacille de Nocard ne fait pas fermenter les sucres et ne coagule pas le lait. Il ne produit pas d'indol dans l'eau peptonisée.

Il pousse sur les cultures raclées de bacille d'Eberth (Voy. 377). Il est agglutiné légèrement par le sérum typhique ; cette agglutination est toujours minime (Gilbert et Fournier) et bien moins prononcée que celle du bacille typhique : la différence d'aptitude à l'agglutination peut servir à différencier les deux microbes (Widal et Sicard), la dose minima d'un sérum susceptible d'agglutiner le bacille typhique est sans action sur le bacille de Nocard.

Le sérum des individus atteints de psittacose semble dépourvu de pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille de Nocard (Gilbert et Fournier, Achard et Bensaude).

Le bacille de Nocard pousse dans les bouillons phéniqués et se développe lentement sur le milieu ioduré d'Elsner.

RECHERCHE.

Le bacille de Nocard sera recherché par les méthodes que nous avons exposées à propos du bacille typhique.

Le développement sur les cultures de bacille typhique raclées, l'aspect de la culture sur pomme de terre, l'action pathogène sur les oiseaux, le peu d'aptitude à l'agglutination par le sérum typhique fourniront les bases du diagnostic différentiel.

CHAPITRE XIV

LE BACTERIUM COLI

Le bacterium coli a été décrit pour la première fois par Escherich. Il présente de grandes analogies avec le bacille typhique avec lequel l'école lyonnaise a voulu le confondre. Pour si ressemblants que soient les deux microbes il existe entre eux des différences telles que leur identification ne saurait être admise. Il n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage de reprendre les arguments des partisans et des adversaires de l'identification; dans l'état actuel de nos connaissances on peut et on doit distinguer le bacterium coli du bacille d'Eberth; le chapitre suivant sera consacré en partie à ce diagnostic différentiel.

Chez l'homme et les animaux le coli bacille se rencontre à l'état normal dans le tube intestinal où il apparaît dès les premières heures qui suivent la naissance. Dans l'intestin de l'enfant il existe à peu près pur à côté du bacille lactique; chez l'homme sain il se trouve associé à de nombreux microbes. Souvent peu virulent dans l'intestin normal, le bacterium coli est susceptible de passer à une virulence extrême dans un grand nombre d'affections, dans tous les états fébriles, la fièvre typhoïde, la plupart des maladies intestinales, etc. (Lesage, Sanarelli, etc.).

Le bacterium coli, devenu virulent, peut être l'agent d'un grand nombre de maladies humaines : il cause des entérites, certains cas de diarrhée cholériforme, de choléra infantile, etc.; on l'a accusé, probablement à tort, d'être l'agent de la dysenterie; il cause des péritonites (péritonites par perforation, péritonites de l'étranglement herniaire, péritonites sans perforation); pénétrant dans les voies biliaires, il détermine des angiocholites suppurées et peut-être des ictères infectieux. Il détermine certaines angines, des broncho-pneumonies, endocardites, péricardites, méningites, etc.; il est l'agent d'un certain nombre d'infections urinaires, on doit l'identifier à la bactérie urinaire de Clado. Chez la femme il joue un

grand rôle dans les affections du petit bassin (salpingites, métrites, etc.). Enfin il cause un bon nombre des complications de la fièvre typhoïde.

On le trouve dans le sol, les eaux souillées par les déjections animales, les poussières, etc.

COLIBACILLOSE EXPÉRIMENTALE.

Le colibacille est pathogène pour le cobaye, le lapin, la souris, etc. Mais il faut savoir que les divers échantillons du bacille présentent une virulence très variable et quelquefois nulle. Dans les matières fécales des sujets sains le bacterium coli est souvent inactif.

On se procure aisément du colibacille très virulent en pratiquant une suture de l'anus chez le cobaye : l'animal ne tarde pas à succomber à l'obstruction intestinale et son péritoine renferme un épanchement louche contenant en culture pure un bacterium coli très actif. Quelquefois dans cet exsudat le bacterium coli se trouve mélangé à un petit nombre d'autres microbes dont on le sépare facilement en pratiquant un isolement sur plaques de gélatine.

Quelques passages par le péritoine du cobaye exaltent rapidement la virulence du bacterium coli.

L'inoculation sous-cutanée d'un bacille peu actif amène d'ordinaire le développement d'un abcès et l'animal guérit; l'inoculation intra-péritonéale est plus grave.

L'inoculation d'un bacille virulent donne lieu aux phénomènes suivants :

Cobaye. — Animal de choix pour l'étude de la colibacillose.

Inoculation intra-péritonéale. — Quelques gouttes d'une culture en bouillon injectées dans le péritoine tuent le cobaye en dix-huit ou vingt-quatre heures, avec des symptômes de péritonite suraiguë et de l'hypothermie. A l'autopsie, on trouve une péritonite généralisée avec un exsudat louche abondant; les anses intestinales sont couvertes de membranes fibrino-purulentes; l'intestin est rempli par des matières diarrhéiques, ses parois sont tuméfiées, congestionnées et présentent parfois des ecchymoses sous-muqueuses ; les plaques de Peyer sont tuméfiées et desquamées ; la rate est hypertrophiée; chez les femelles les genitalia sont congestionnés, il n'est pas rare de voir l'utérus rempli par un exsudat hémorragique. Le bacille d'Escherich se trouve dans le sang et les viscères.

Inoculation intra-pleurale. — La mort survient en vingt ou vingt-quatre heures ; à l'autopsie il existe une pleurésie à liquide louche

ou hémorragique, avec dépôts fibrineux sur les poumons, un épanchement péricardique, de la congestion des poumons et de l'intestin et de la tuméfaction de la rate. Le bacille se retrouve dans le sang et les organes.

Inoculation sous-cutanée. — Moins sévère que les précédentes, elle exige des doses plus considérables de culture pour entraîner la mort (1 à 2 centimètres cubes). Dans ce cas il se produit un phlegmon au point d'inoculation, le bacille se généralise et la mort survient en trente-six ou quarante-huit heures. A l'autopsie on constate la tuméfaction des plaques de Peyer et de la rate, de la congestion et des ecchymoses de l'intestin.

Souris. — La souris succombe à l'inoculation du coli bacille avec les mêmes lésions que le cobaye.

Lapin. — Le lapin est un peu moins sensible que le cobaye. Les inoculations intra-péritonéale, intra-pleurale et sous-cutanée exigent des doses plus fortes pour entraîner la mort (mêmes lésions que chez le cobaye).

Quand la dose inoculée a été faible, le lapin ne succombe qu'au bout de quelques jours et présente des foyers de suppuration dans les ganglions mésentériques, le foie et la rate.

L'inoculation intra-veineuse tue très rapidement le lapin en produisant une septicémie coli-bacillaire avec les lésions ordinaires du côté de l'intestin et de la rate. Dans certains cas, après l'inoculation intra-veineuse de quelques gouttes de culture en bouillon, le lapin ne succombe pas rapidement; la survie peut être de plusieurs mois et l'animal présente une paralysie atrophique liée à une polyomyélite antérieure signalée pour la première fois par Gilbert et Lion ; le lapin ne succombe pas fatalement à cette affection médullaire, on a pu observer des cas de guérison même quand l'animal présentait des symptômes très accentués.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le bacille d'Escherich, comme le bacille d'Eberth, est un petit bâtonnet à bouts arrondis ; chez les deux microbes la taille est identique et sujette aux mêmes variations. Les formes en navette, les pseudo-spores se rencontrent chez le bacterium coli.

Coloration. — Le bacille d'Escherich présente les mêmes réactions que le bacille d'Eberth vis-à-vis des matières colorantes; comme ce dernier il se décolore par le Gram.

Mobilité et cils vibratiles. — La mobilité du bacterium coli est en général beaucoup moins accentuée que celle du bacille typhique; elle est du reste très variable pour les bacilles de différentes provenances; certains échantillons sont immobiles, chez d'autres ces mouvements sont lents et peu étendus, enfin certaines races ont une mobilité voisine de celle du bacille d'Eberth.



Fig. 165. — Bacterium coli. — Culture en bouillon. — Thionine phéniquée (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Les *cils* du bacterium coli ne ressemblent que de très loin à ceux du bacille d'Eberth; on les colore par les mêmes procédés, mais l'opération est plus difficile à réussir.

Le nombre des cils du bacterium coli est toujours inférieur à celui des cils du bacille typhique; on ne compte guère que 4 à 6 flagella par bacille, le chiffre de 12 est absolument exceptionnel.



Fig. 166. — Cils du bacterium coli. — Coloration par la méthode de Nicolle (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

Les cils peuvent s'implanter sur toute la surface du bacille; plus souvent ils sont disposés en un ou deux bouquets insérés sur un point quelconque du corps du bacille, mais de préférence vers une extrémité.

Ces cils sont deux à trois fois moins longs que ceux du bacille d'Eberth; leur longueur ne dépasse guère 3 à 5 μ; ils sont aussi moins flexueux, moins ondulés; jamais dans les préparations on n'observe les broussailles de cils enchevêtrés si caractéristiques du bacille d'Eberth.

L'examen des cils, aujourd'hui à la portée de tous les bactériologistes, ne doit jamais être négligé quand il s'agit de caractériser un bacterium coli.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Elles sont les mêmes pour le bacille d'Eberth et le bacterium coli. La propriété de se développer à 45° appartient aux deux microbes. Le développement du coli bacille est toujours un peu plus rapide que celui du bacille d'Eberth ensemencé dans les mêmes conditions. Les cultures du bacterium coli répandent une odeur fade, fécaloïde, caractéristique.

Bouillon. — A 37°, le développement est apparent dès la sixième ou la huitième heure ; les caractères de la culture sont les mêmes que pour le bacille d'Eberth, cependant il se forme fréquemment à la surface du liquide une pellicule grisâtre que l'on n'observe qu'exceptionnellement avec le bacille d'Eberth.

Gélatine. — Le bacterium coli ne liquéfie pas la gélatine.

Piqûre. — Culture plus rapide que celle du bacille d'Eberth; développement apparent dès la vingt-quatrième ou trentième heure. Les petites colonies développées le long de la piqûre s'opacifient et deviennent confluentes assez rapidement ; à la surface il se forme un enduit blanchâtre, abondant, crémeux pouvant atteindre les bords du tube.

En résumé : culture plus abondante et plus rapide que celle du bacille d'Eberth ; mais la différence est souvent peu marquée et ne peut être utilisée pour baser un diagnostic.

Strie sur gélatine inclinée. — Dès la trentième heure, apparition d'un enduit bleuâtre, peu épais, à contours festonnés, devenant blanchâtre et opaque en vieillissant. Dans les cas types, la culture est plus abondante et plus opaque que celle du bacille typhique.

Colonies isolées. — En règle, développement de petites colonies lenticulaires à contours découpés, transparentes et bleuâtres d'abord, puis blanches et opaques, plus larges que celles du bacille typhique ; mais, fréquemment, les colonies restent transparentes et gardent l'aspect en montagne de glace caractéristique du bacille d'Eberth.

Les colonies qui se développent dans la profondeur de la gélatine ont l'apparence de petits grains blanchâtres opaques.

Gélose et sérum solidifié. — Enduit blanchâtre analogue à celui du bacille typhique. Parfois il se produit des bulles de gaz qui soulèvent la culture.

Pomme de terre. — En règle, le bacterium coli fournit sur pomme de terre une culture jaunâtre d'abord, puis brune, épaisse, saillante, à surface humide ; mais certains échantillons donnent des cultures minces, non colorées, en glacis, identiques à celles du

bacille type. L'aspect est fort variable suivant la qualité et l'espèce de la pomme de terre employée.

Sur le milieu de Remy et Sugg le bacterium coli donnerait d'une façon constante une culture abondante, épaisse, glaireuse ou sèche et toujours colorée en jaune ou en brun.

Lait. — Le lait est coagulé en vingt-quatre ou trente heures à 37° par le bacterium coli.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Variabilité des cils. — Les recherches de Remy et Sugg ont montré que pour le coli bacille comme pour le bacille d'Eberth, l'action des antiseptiques et des températures dysgénésiques est à peu près sans influence sur le nombre et le caractère des cils.

Action sur les sucres. — A l'état aérobie, comme à l'état anaérobie, le bacterium coli décompose, en produisant de l'hydrogène, de l'acide carbonique, de l'alcool éthylique et des acides (formique, acétique, butyrique, lactique), la lactose, la saccharose, la maltose, la glycose et aussi l'érythrite et la mammite.

Cette propriété mise en lumière, selon les procédés que nous avons étudiés à propos du bacille typhique, fournit d'excellents éléments de diagnostic :

a) La culture dans le bouillon lactosé additionné de carbonate de chaux dégage vers la douzième ou la vingtième heure de très nombreuses bulles de gaz carbonique résultant de l'action des acides produits sur le carbonate de chaux.

b) Le développement du bacterium coli sur la gélose lactosée tournesolée entraîne le virage de la teinte bleue au rouge, puis à la teinte pelure d'oignon.

c) Le bacterium coli coagule le lait.

d) Les cultures en petit-lait présentent rapidement une acidité considérable, saturant 7 à 12 p. 100 de solution décinormale de soude.

Indol. — Le bacterium coli produit de l'indol dans les cultures en eau peptonisée (Voy. p. 376) ; c'est là un caractère très important et d'une grande constance.

La valeur de la réaction de l'indol dans le diagnostic du bacterium coli a été mise en doute par de nombreux auteurs (Rodet et Roux, Malvoz, Dunbar, etc.) qui échouaient souvent à déceler la présence de l'indol dans les cultures de ce bacille. Des recherches plus récentes de Péré, Van Ermengen, Remy et Sugg, etc., montrent que les résultats négatifs tiennent souvent à l'imperfection de la technique employée : « la fonction de

l'indol est bien moins sujette à varier qu'on se plaît à le croire ». Elle fournit un des meilleurs signes d'identification que nous possédions, à la condition d'opérer avec les précautions suivantes :

1° Faire une culture en eau peptonisée et non en bouillon ordinaire. (D'après Péré, il serait préférable de substituer à la peptone ordinaire la peptone pancréatique.)

2° Examiner cette culture du troisième au dixième jour, jamais plus tard.

3° Effectuer la réaction en suivant exactement la technique indiquée à propos du bacille typhique.

Cultures en milieux minéraux. — Le bacterium coli produit d'ordinaire une culture luxuriante dans les solutions minérales de Nægeli, Maasse, Remy et Sugg (Voy. p. 377).

Développement sur les milieux vaccinés. — Sur des tubes de gélose ou de gélatine où l'on a cultivé des bacilles d'Eberth et qui ont été raclés comme nous l'avons dit plus haut, l'ensemencement de coli bacille donne d'ordinaire lieu à un développement moins abondant que sur les tubes neufs, mais manifeste.

Milieux colorés. —Comme le bacille typhique le bacterium coli se développe en décolorant le milieu de Nœggerath et la gélose fuchsinée.

Vitalité. — Le bacterium coli présente vis-à-vis des agents de destruction une résistance analogue à celle du bacille d'Eberth. Dans les cultures il est détruit rapidement par l'exposition à des températures de + 60° à + 80°, mais il résiste beaucoup mieux quand il est englobé dans des matières fécales desséchées.

Agglutination. — Le sérum des animaux vaccinés contre le bacille d'Eberth et celui des typhoïdiques ne possèdent pas la propriété d'agglutiner le bacterium coli, mais, pour que cette réaction ait une valeur, il est important qu'elle soit faite en observant certaines règles.

Tous les sérums humains, en effet, qu'ils proviennent ou non de typhoïdiques, exercent une légère action agglutinante sur le bacterium coli dans les dilutions comprises entre 1/5e et 1/10e. On conçoit que cette propriété du sérum humain pourrait induire en erreur un observateur non prévenu, toute erreur est d'ailleurs facile à éviter en opérant de la façon suivante :

Commencer par déterminer exactement le pouvoir agglutinant du sérum antityphique qui servira à la réaction; puis faire agir sur la culture de bacterium coli la dose minima de sérum qui suffit pour agglutiner nettement le bacille d'Eberth, soit par exemple un sérum agglutinant nettement le bacille typhique à la dose minima de 1/100e, c'est cette dilution à 1 p. 100 qui devra être employée pour éprouver le coli bacille. Dans ces conditions on n'observe jamais d'agglutination du coli bacille et on peut utiliser la réaction de Vidal comme un excellent élément de diagnostic différentiel.

Sérum antityphique. — Les animaux vaccinés contre le bacille d'Eberth par les procédés que nous avons indiqués ont acquis en même temps l'immunité vis-à-vis du bacterium coli ; il semble au contraire que le sérum des chevaux vaccinés contre le bacille typhique soit dépourvu d'action préventive ou curative vis-à-vis du bacterium coli.

Nous ne pouvons terminer ce chapitre sans dire un mot de deux bactéries très voisines du bacterium coli et que l'on rencontre fréquemment dans le contenu intestinal.

BACILLUS LACTIS AEROGENES.

Ce bacille se rencontre dans l'intestin des enfants et des adultes soumis au régime lacté ; il se trouve également dans le lait fermenté.

Il est pathogène pour le lapin et le cobaye chez lesquels il produit une infection analogue à la coli-bacillose.

Aspect microscopique.

Bacille court, épais, à bouts arrondis, ayant fréquemment l'aspect d'une navette ou d'un biscuit par suite de la production d'un léger étranglement à sa partie moyenne. Il est immobile et souvent groupé en chaînettes de 2 à 3 éléments.

Il se colore aisément par les couleurs basiques et ne prend pas le Gram.

Cultures.

Le bacillus lactis aerogenes est indifféremment anaérobie ; il se développe aisément sur les milieux ordinaires en dégageant une odeur fétide.

Bouillon. — Trouble abondant avec production d'une pellicule irisée à la surface et précipitation de grumeaux au fond du tube.

Gélatine. — Pas de liquéfaction ; ces cultures rappellent celles du bacterium coli, mais les colonies sont plus épaisses et plus opaques.

Gélose et sérum. — Mêmes caractères que le bacterium coli.

Pommes de terre. — Milieu de Remy et Sugg. — Enduit crémeux, puis jaune brun.

Lait. — Coagulation rapide.

Indol. — Production d'indol dans l'eau peptonisée.

Sucres. — Le bacillus lactis aerogenes fait fermenter les sucres et se

comporte en tous points comme le bacille coli dans les milieux glucosés, lactosés, etc.

BACILLE DE LA DIARRHÉE VERTE.

Ce bacille ne serait, d'après Lesage et Thiercelin, qu'une variété chromogène du bacterium coli. Il se trouve à l'état de pureté presque complète dans les selles des enfants atteints de diarrhée verte.

Le bacille de la diarrhée verte est peu pathogène pour les animaux de laboratoire; chez le lapin l'injection intra-veineuse ou l'injection de cultures amènent la production d'une diarrhée verte; l'animal se rétablit en peu de jours.

Aspect microscopique.

Bâtonnets courts à bouts arrondis absolument analogues au bacterium coli et pouvant présenter les mêmes variations morphologiques que ce dernier.

Cultures.

Le bacille de la diarrhée verte est facultativement aérobie; il se développe sur les milieux ordinairement employés en produisant une odeur fade, désagréable.

On l'obtient facilement à l'état pur en faisant un isolement sur plaques de gélatine avec une trace des matières fécales d'un enfant atteint de diarrhée verte.

Bouillon. — Trouble uniforme, puis dépôt d'un sédiment verdâtre.

Gélatine. — Pas de liquéfaction.

La piqûre produit une culture grêle, blanchâtre, avec un petit enduit lenticulaire verdâtre à la surface; la strie sur gélatine inclinée produit une culture mince, étendue; verdâtre; au bout de quelques jours la gélatine prend une teinte verte uniforme.

Les colonies isolées se présentent comme de petits disques granuleux verdâtres.

Gélose. — Culture mince, étalée, verdâtre; coloration verte de la gélose.

Pomme de terre. — Enduit abondant envahissant toute la surface de la pomme de terre, présentant un aspect muqueux et coloré en vert sale.

Lait. — Coagulation rapide.

Milieux sucrés. — Fermentation énergique.

CHAPITRE XV

RECHERCHE DU BACTERIUM COLI ET DU BACILLE D'EBERTH DANS LES EAUX, LES FÈCES, ETC. DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES DEUX BACILLES

La recherche du bacille typhique dans les milieux où il se trouve mélangé à de nombreuses espèces microbiennes et particulièrement au bacterium coli présente des difficultés que l'on peut ramener à trois ordres de faits :

1° Sur la gélatine, à la température ordinaire, les colonies du bacille typhique se développent lentement (quarante-huit heures environ) ; avant elles poussent les microbes saprophytes qui liquéfient rapidement la plaque et arrêtent la recherche.

2° Quand on ensemence un mélange de bacterium coli et de bacille d'Eberth, le plus souvent le développement du bacille coli empêche celui du bacille d'Eberth et ce dernier microbe passe inaperçu : il y a là une véritable *action empêchante* mise en évidence par Grimbert. Différentes espèces microbiennes jouissent dans les milieux artificiels de la même propriété empêchante vis-à-vis du bacille d'Eberth (Besson).

3° La méthode des plaques de gélatine ordinaire ne permet d'ensemencer qu'une très petite quantité de l'eau suspecte : on conçoit dès lors que si le bacille se trouve dans l'eau en faible proportion, il puisse passer inaperçu.

Aussi les bactériologistes se sont-ils ingéniés à imaginer des procédés spéciaux permettant de déceler sûrement la présence du bacille typhique dans les eaux. Tous ces procédés s'appliquent également à la recherche du bacterium coli.

Les différents procédés utilisés jusqu'à ces derniers temps ne fournissent que des résultats fort aléatoires : en règle, ils sont impuissants

à déceler le bacille d'Eberth quand il se trouve associé au bacterium coli. Seul le procédé qu'a récemment fait connaître Elsner permet d'isoler à coup sûr le bacille typhique quand il est mélangé au bacterium coli.

I. — PROCÉDÉS ANCIENS.

I. **Procédé de Rodet.** — Rodet a montré que le bacterium coli et le bacille typhique se développent rapidement à 45° alors que la plupart des autres bactéries ne cultivent plus à cette température. Sur ce fait Rodet a basé un procédé de recherche de ces microbes dans l'eau ; une certaine quantité (20 à 100 centimètres cubes) de l'eau suspecte est versée dans un matras contenant du bouillon de bœuf ordinaire stérilisé ; puis le matras est placé à l'étuve à 45°. Si le bouillon est trouble au bout de vingt à vingt-quatre heures, il y a de fortes présomptions pour que ce trouble relève de la présence du bacterium coli ou du bacille d'Eberth. Un examen de la culture et au besoin un isolement sur plaques de gélatine permettent de lever tous les doutes.

Ce procédé permet de découvrir le bacille d'Eberth quand il n'est pas associé au bacterium coli ; mais dans les cas les plus fréquents, où le bacille d'Eberth existe à l'état de mélange au bacterium coli, l'isolement du premier de ces microbes est impossible.

II. **Procédé de Chantemesse et Widal.** — Chantemesse et Widal montrent que le bacterium coli et le bacille d'Eberth se développent dans les milieux de culture additionnés de 1/400 d'acide phénique, et appliquent ce principe à la recherche des deux microbes dans l'eau.

A des tubes contenant 20 centimètres cubes de gélatine ordinaire liquéfiée à une douce chaleur on ajoute 1 centimètre cube de solution phéniquée à 5 p. 100 et quelques gouttes de l'eau à analyser ; puis on coule le contenu des tubes dans des boîtes de Petri. Sur les plaques obtenues par ce procédé il se développe malheureusement un certain nombre de bactéries liquéfiantes qui entravent rapidement la recherche. Il est d'ailleurs nécessaire d'ensemencer pour chaque analyse un grand nombre de plaques, étant donnée la petite quantité d'eau utilisée pour chaque ensemencement ; enfin ce procédé échoue à permettre l'isolement du bacille d'Eberth quand il est mélangé au bacterium coli.

III. **Procédé de Vincent.** — Vincent en combinant les résultats des observations de Rodet d'une part, de Chantemesse et Widal d'autre part, a composé un procédé mixte, qui jusqu'à ces derniers

temps a été le procédé de choix, mais qui doit être abandonné aujourd'hui pour le procédé d'Elsner.

Vincent pratique les ensemencements dans du bouillon phéniqué à 1/1000 et fait la culture à + 41°,5 ou + 42°.

En pratique, on prépare 6 tubes contenant 10 centimètres cubes de bouillon ordinaire ; au moment du besoin on ajoute à chacun d'eux 5 à 6 gouttes d'une solution phéniquée à 5 p. 100 et 1/2 à 1 centimètre cube de l'eau suspecte ; chaque tube est muni d'un capuchon de caoutchouc au-dessus du tampon d'ouate, pour éviter l'évaporation de l'acide phénique. Les tubes sont placés à l'étuve à + 41°5 ou 42°. S'il se produit un trouble vers la douzième-vingtième heure on réensemence le contenu des tubes troublés dans de nouveaux tubes de bouillon phéniqué que l'on place également à 41°,5. Ce second passage donne en général une culture pure de bacterium coli quand l'eau contenait ce bacille ; cependant il faut savoir que quelques saprophytes (bacillus subtilis, bacillus mesentericus, bacillus luteus, streptocoque blanc de l'eau, proteus vulgaris, etc.) se développent dans ces conditions. On ne peut songer à se débarrasser de ces microbes par des passages successifs en milieux phéniqués : une fois accoutumés aux milieux phéniqués ils s'y développent aussi bien que le bacille coli.

La présence d'un trouble à ondes soyeuses dans les tubes constitue un bon signe du bacille coli ou du bacille typhique, mais il faudra toujours compléter la recherche par l'examen microscopique et au besoin par un isolement sur gélatine. Le microbe isolé sera soumis à toutes les épreuves que nous énumérerons plus loin.

Il faut savoir que dans le bouillon phéniqué le bacterium coli et le bacille d'Eberth se présentent souvent sous la forme de cocco-bacilles accouplés par deux et immobiles.

Le procédé de Vincent ne permet pas l'isolement du bacille typhique quand il se trouve mélangé au bacterium coli.

IV. **Procédé de Péré.** — Le procédé de Péré n'est qu'une modification dont le but est de permettre l'ensemencement de grandes quantités de l'eau à examiner.

On prépare un bouillon très fortement nutritif (Viande 1000. Eau 1000, Peptone 50). Ce bouillon est réparti dans des fioles de Vivien à raison de 30 centimètres cubes par fiole. On stérilise à l'autoclave, puis, au contenu de chaque fiole on ajoute 3 centimètres cubes de solution phéniquée à 5 p. 100 et une quantité d'eau à analyser suffisante pour faire 150 centimètres cubes. On prépare ainsi 5 à 6 fioles qu'on place à l'étuve à + 41°5. — Dès qu'un trouble se produit (quinzième-vingtième heure) on ensemence avec le contenu des fioles troublées

des tubes de bouillon phéniqué à 1/1000 et l'on place ces tubes à l'étuve à + 41°,5. On termine la recherche comme dans le procédé de Vincent.

II. — MÉTHODE D'ELSNER.

Méthode recommandée.

Cette méthode permet de déceler le bacille typhique dans les milieux (eaux, fèces, etc.) où il est associé au bacterium coli, elle est basée sur ce fait que le bacille typhique et le bacterium coli se developpent à l'exclusion de la plupart des autres microbes sur une gelée de pommes de terre additionnée d'iodure de potassium.

On opérera de la façon suivante :

1° On prépare une série de tubes à essai contenant 19 centimètres cubes de macération de pomme de terre gélatinisée (Voy. p. 40) et on les stérilise à l'autoclave. D'un autre côté on stérilise la solution suivante :

Eau distillée	50	grammes.
Iodure de potassium	10	—

2° Au moment du besoin on ajoute à chaque tube de gelée de pomme de terre liquéfiée à douce chaleur 1 centimètre cube (vingt gouttes) de la solution iodurée. On obtient ainsi une gélatine iodurée à 1 p. 100.

3° Chacun des tubes ainsi préparés est ensemencé avec quelques gouttes de l'eau suspecte; puis le contenu du tube est coulé dans une boîte de Pétri et abandonné à la solidification. On doit préparer ainsi un grand nombre de boîtes, étant donnée la petite quantité d'eau qui sert à faire chaque ensemencement ; on ne doit jamais préparer moins de 6 à 8 plaques.

4° D'après Elsner sur ces plaques le bacterium coli donne à 20°, dès le deuxième jour, des colonies arrondies opaques ; les colonies de bacilles d'Eberth au contraire apparaissent seulement vers le quatrième jour et sont plus petites, transparentes, à peine visibles; les autres bactéries ne se développent pas.

En réalité, diverses bactéries, et même des liquéfiantes, se développent sur les plaques, et les caractères des colonies du bacille d'Eberth et du bacterium coli ne sont pas aussi différenciés que l'a dit Elsner ; il faut bien savoir que le milieu d'Elsner ne possède aucune propriété spécifique qui lui permettrait d'assurer le développement du bacterium coli et du bacille d'Eberth à l'exclusion des autres microbes ; son seul avantage est de permettre le développement du bacille d'Eberth à côté de celui du bacterium coli.

On devra par conséquent étudier avec soin toutes les colonies non

liquéfiantes et non chromogènes qui se développent sur les plaques; ces colonies seront prélevées avec une öse de platine forte et reportées dans des tubes de bouillon à + 37°. Au bout de vingt à vingt-quatre heures, l'examen des cultures de bouillon sera pratiqué et renseignera sur la morphologie des microbes isolés; on ne retiendra alors que les cultures produites par de courts bacilles à bouts arrondis, cultures qui seront immédiatement soumises aux épreuves que nous énumérerons plus loin.

Si une de ces cultures suspectes présentait une impureté, on pratiquerait un nouvel isolement sur gelée d'Elsner : une öse de la culture serait portée dans un premier tube, dont une goutte servirait à ensemencer un tube n° 2, dont trois gouttes serviraient à ensemencer un tube n° 3 (Voy. la méthode générale p. 83).

La recherche du bacterium coli et du bacille typhique dans les matières fécales serait pratiquée d'une manière analogue : un tube de gélatine iodurée est ensemencé avec une trace de matières fécales; après agitation une goutte du contenu de ce tube sert à ensemencer un tube n° 2, dans lequel on prélève enfin deux ou trois gouttes pour ensemencer un tube n° 3. Sur les plaques préparées avec le contenu de chacun de ces tubes on étudie les diverses espèces de colonies non liquéfiantes comme il a été dit plus haut.

DIAGNOSTIC DU BACTERIUM COLI ET DU BACILLE TYPHIQUE.

I. — Un bacille est suspect d'appartenir au groupe des bacilles d'Eberth ou d'Escherich quand il présente les caractères suivants :

1° Bacille à bouts arrondis, mobile ou non, décolorable par le Gram.

2° Troubles avec ondes soyeuses des cultures en bouillon.

3° Pas de liquéfaction de la gélatine (Voy. aux chapitres précédents les caractères des cultures).

II. — Ce point une fois établi, il reste à déterminer si la culture (pure, bien entendu) relève du bacille d'Eberth ou du bacterium coli ; pour résoudre cette question on aura recours aux épreuves suivantes :

	BACTERIUM COLI	BACILLE D'EBERTH
1° Ensemencement en bouillon lactosé carbonaté à + 37°.	Dégagement de bulles de gaz abondantes (12°-36° heure).	Pas de dégagement de gaz.
2° Ensemencement en strie sur de la gélatine lactosée additionnée de tournesol.	Virage de la teinte bleue au rouge, puis à la teinte pelure d'oignon le long de la strie.	Pas de virage.
3° Culture en lait.	Coagulation en 24-36 heures.	Pas de coagulation.
4° Culture sur pomme de terre et sur le milieu de Remy et Sugg.	Culture épaisse brunâtre (?).	Culture mince, incolore en glacis (?).
5° Culture en solution minérale de Nægeli, Remy et Sugg, etc.	Culture abondante et rapide (?).	Culture tardive et grêle (?).
6° Culture en eau peptonisée.	Produit de l'indol.	Ne produit pas d'indol.
7° Examen des cils.	Cils peu nombreux (3 à 4 par bacille) et courts.	Cils nombreux (8-18), longs, flexueux, onduleux.
8° Action du sérum antityphique (Dose agglutinante minima).	Pas d'agglutination.	Agglutination nette.
9° Inoculation au cobaye.	Résultats très variables suivant la virulence du microbe.	Résultats très variables suivant la virulence du microbe.
10° Inoculation simultanée du sérum antityphique.	Si le bacille est virulent, l'inoculation simultanée de sérum antityphique ne préserve pas l'animal (?).	Quand le bacille est virulent, l'inoculation simultanée de sérum antityphique préserve l'animal.

Pour poser le diagnostic on ne devra jamais se contenter d'une seule des épreuves que nous venons d'indiquer. Les variations que l'on observe dans la morphologie des deux bacilles et aussi l'existence d'espèces voisines encore mal connues, mettent le bactériologiste dans l'obligation de ne se prononcer qu'après avoir recueilli un faisceau de caractères convergents ; il est nécessaire en tous cas de rechercher au moins les propriétés fermentatives, la fonction de l'indol, les caractères des cils et l'agglutination.

CHAPITRE XVI

LE BACILLE DE LA PESTE

Le bacille de la peste a été découvert et étudié par Yersin. On le rencontre constamment dans la pulpe des bubons des pestiférés, quelquefois aussi dans le sang, dans les cas graves et rapidement mortels.

Dans les épidémies de peste, un grand nombre d'animaux sont frappés en même temps que les hommes; la peste sévit avec une grande intensité sur les rats, les souris, les buffles et les porcs. Les mouches elles-mêmes n'échappent pas au fléau; elles tombent en grande quantité sur le sol et leurs cadavres broyés et inoculés aux cobayes leur communiquent l'infection.

L'homme prend la peste, soit par des plaies de la peau, soit par le tube digestif. Les symptômes d'entérite ne sont pas rares et parfois on ne trouve aucune glande apparente, mais à l'autopsie on constate une tuméfaction des ganglions mésentériques constituant un bubon interne. Wilm a trouvé le bacille dans les déjections des pestiférés et aussi dans leurs crachats.

Au moment des épidémies de peste et même après la disparition de la maladie, on trouve le microbe de la peste dans le sol des localités infectées; ce microbe est moins virulent que celui retiré des bubons.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE.

Les animaux de laboratoire sont réceptifs à la peste.

La souris, le rat, le cobaye, le lapin auxquels on a inoculé de la pulpe de bubon succombent à la peste et, à l'autopsie, on trouve les lésions caractéristiques : bubons, nombreux bacilles dans les ganglions, la rate et le sang.

L'inoculation dans les veines est plus sévère que l'inoculation sous-cutanée. Le cobaye meurt en deux à cinq jours, la souris en un à trois jours. Chez le cobaye, peu d'heures après l'inoculation ap-

paraît un œdème localisé au niveau du lieu de l'injection, puis les ganglions voisins se tuméfient ; au bout de vingt-quatre heures, le poil se hérisse, l'animal tombe bientôt sur le côté et présente des crises convulsives qui se répètent jusqu'à la mort.

A l'autopsie, on trouve un œdème rosé au point d'inoculation et au pourtour du ganglion voisin qui lui-même est volumineux et renferme de nombreux bacilles. Les organes abdominaux sont tuméfiés et congestionnés, la rate très volumineuse présente souvent une éruption de petits tubercules miliaires; quand la maladie s'est prolongée, on trouve parfois des abcès de la paroi abdominale. Dans la plèvre et le péritoine, il existe un peu de sérosité contenant le bacille. Nombreux bacilles dans les ganglions, le foie, la rate et le sang.

Les passages de cobaye à cobaye faits à l'aide de la pulpe de rate ou du sang, exaltent la virulence du microbe.

En faisant des séries de passages, on arrive à obtenir des bacilles de virulence fixe pour l'espèce animale sur laquelle on opère; on arrive par exemple à tuer régulièrement les souris en deux jours, le cobaye en deux ou trois jours, le lapin en trois jours. Le microbe tuant la souris en deux jours demande, lorsqu'on l'inocule à un lapin, un temps assez long pour tuer l'animal; au bout de quelques passages, il finit par tuer régulièrement le lapin en trois jours, mais alors il a perdu de sa virulence envers la souris et il faut quelques passages de souris à souris pour la lui rendre (Yersin, Calmette et Borel).

On peut communiquer la peste aux rats et aux souris en leur faisant ingérer des cultures du bacille spécifique ou des organes d'animaux ayant succombé à l'infection; à l'autopsie, on trouve le bacille dans le sang, la rate, le foie et les ganglions. Certains individus, particulièrement parmi les souris, résistent à ce mode d'infection.

En plaçant dans le même local des souris saines et des souris inoculées, Yersin a constaté que les souris saines prenaient la peste et succombaient toutes avec les lésions caractéristiques.

Le pigeon est peu réceptif et ne succombe qu'à l'inoculation de fortes doses de culture.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le microbe de la peste est un bacille court, trapu, dont les extrémités sont arrondies, ou plus exactement un coccus bacille. Il est

excessivement abondant dans la pulpe des bubons; dans le sang, il est un peu plus allongé que dans les bubons.



Fig. 167. — Bacille de la peste. — Frottis de ganglion, d'après Yersin.

Dans les cultures, il se groupe en chaînettes et présente parfois de place en place de gros renflements en boule; sur la gélose, à côté de ces formes, on peut rencontrer de grosses chaînes constituées par des bâtonnets accolés latéralement. Les formes renflées sont plus nombreuses dans les cultures anciennes; elles se colorent mal.

Coloration. — Le bacille de la peste se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline; il ne se colore pas par la méthode de Gram.

Les extrémités du bacille se colorent plus fortement que le centre, de sorte qu'il présente souvent un espace clair en son milieu. Quelquefois les bacilles semblent entourés d'une capsule.

CULTURES.

Le bacille de la peste est aérobie et cultive aisément dans les milieux ordinaires à $+35^c$, $+37^c$.

Bouillon. — La culture prend un aspect très analogue à celui des cultures de streptocoque, des grumeaux adhèrent aux parois, le liquide restant clair, puis les grumeaux se précipitent au fond du tube.

D'après Yersin, la solution alcaline de peptone à 2 p. 100 additionnée de 1 à 2 p. 100 de gélatine constitue le milieu le plus favorable.

Gélose. — Le bacille cultive sur la gélose ordinaire, la gélose glycérinée et le sérum solidifié.

Quand on ensemence de la pulpe de bubon sur gélose, il se développe des colonies blanches, transparentes, présentant des bords irisés quand on les examine à la lumière réfléchie.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Elles sont encore mal connues. Le bacille de la peste est fragile: sa virulence baisse et disparaît rapidement dans les cultures. Yersin

a constaté que la pulpe des bubons ensemencée sur gélose donne des colonies de différente virulence : certaines de ces colonies, plus volumineuses, sont très peu virulentes, leur développement est beaucoup plus rapide que celui des colonies virulentes, si bien qu'elles finissent par étouffer celles-ci et que les cultures successives perdent rapidement de leur virulence.

La vitalité du bacille disparaît rapidement sous l'influence de la chaleur : les cultures en milieux liquides sont stérilisées par un séjour d'une heure à + 58°.

VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE.

I. — Yersin, Calmette et Borrel ont essayé d'immuniser des lapins en leur injectant des cultures filtrées, mais ces cultures se sont montrées inactives.

II. — Les mêmes auteurs ont alors eu recours à l'injection de grandes quantités de bacilles tués par la chaleur. Ils raclent des cultures sur gélose, les délayent dans une très petite quantité de bouillon qu'ils enferment dans des tubes scellés et chauffent une heure à + 58°.

Inoculées à haute dose dans les veines ou le péritoine, ces cultures chauffées tuent le lapin.

Une ou deux injections dans les veines ou le péritoine d'une quantité de ces cultures suffisante pour rendre les animaux malades sans les tuer, vaccinent contre l'inoculation sous-cutanée du bacille vivant et virulent, à la condition que cette inoculation soit faite alors que l'animal est parfaitement rétabli de l'injection vaccinale.

On peut aussi vacciner par injection sous-cutanée de cultures chauffées, mais le procédé est plus long : il faut, en général, trois ou quatre injections faites de quinze jours en quinze jours pour vacciner le lapin.

Le cobaye est beaucoup plus difficile à immuniser et on réussit rarement à lui conférer une immunité complète.

Le sérum des lapins immunisés est préventif et curatif : à la dose de trois centimètres cubes, il préserve un lapin neuf contre l'inoculation sous-cutanée de peste virulente ; à la même dose, il arrête l'infection et guérit l'animal, quand il est injecté douze heures après une inoculation du virus.

III. — Les auteurs ont tenté alors l'immunisation du cheval.

Le cheval réagit vivement à l'inoculation sous-cutanée d'un quart de culture de peste sur gélose ; il présente une élévation considéra-

ble de la température centrale et une tuméfaction notable suivie de la formation d'un abcès au point d'inoculation.

Pour obtenir l'immunisation, il est préférable d'injecter le virus dans les veines.

Le cheval reçoit un quart de culture de gélose dans la jugulaire ; la réaction est intense et dure plusieurs jours. Quand l'animal est parfaitement rétabli, on répète les injections à doses de plus en plus fortes, mais à intervalles éloignés. Les animaux maigrissent beaucoup pendant l'immunisation et il faut avoir soin de ne pas précipiter les inoculations.

Le sérum recueilli sur des chevaux immunisés, trois semaines après la dernière injection, se montre préventif pour la souris à la dose de 1/10 de centimètre cube et curatif à la dose de 1 à 1,5 centimètre cube (injecté 12 heures après l'inoculation).

Yersin a utilisé ce sérum pour le traitement de la peste humaine et les premiers résultats sont absolument favorables à la méthode. Aux doses de 20 à 90 centimètres cubes, le sérum a guéri, dans les 23 premières observations d'Yersin, 21 fois la peste ; l'injection du sérum est d'autant plus efficace qu'elle a été pratiquée à un moment plus rapproché du début de la maladie ; la dose de sérum doit être plus considérable chez les malades atteints depuis plusieurs jours. Dans les 23 observations d'Yersin, les deux morts se rapportent à des malades chez lesquels le traitement n'a été commencé que le cinquième jour après le début de la maladie.

CHAPITRE XVII

LE COCCUS DE LA FIÈVRE MÉDITERRANÉENNE

Bruce a décrit sous le nom de *fièvre méditerranéenne* (ou fièvre de Malte) une maladie qui sévit à Malte et qui était confondue jusqu'à lui soit avec la fièvre typhoïde, soit avec la fièvre palustre.

Bruce a montré que l'agent spécifique de la fièvre méditerranéenne est un coccus qu'il a décrit sous le nom de *micrococcus melitensis*; ses recherches ont été confirmées par celles de Gipps et de Hughes.

A Malte la fièvre méditerranéenne est endémique et atteint chaque année environ 3 p. 100 de l'effectif de la garnison anglaise; parfois elle devient épidémique et peut alors causer une morbidité de 15 et de 20 p. 100.

A l'autopsie des individus ayant succombé à la fièvre méditerranéenne le micrococcus melitensis se trouve en culture pure dans la rate, le foie, les reins. Il ne passe jamais dans le sang. Pendant la vie, on peut l'obtenir aisément par ponction de la rate des individus atteints.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE.

Le lapin, le cobaye, la souris sont réfractaires au micrococcus melitensis, seul le *singe* s'est montré réceptif.

A la suite de l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité de culture sur gélose délayée dans un peu d'eau stérile, le singe présente une maladie analogue à celle de l'homme. La température centrale s'élève de 2 à 3 degrés tout en présentant fréquemment des rémissions quotidiennes qui donnent à la courbe une certaine ressemblance avec celle de la fièvre rémittente palustre; souvent une période d'apyrexie interrompt pour quelques jours le cours de la fièvre, puis la température s'élève de nouveau.

La maladie peut se prolonger pendant des mois et aboutir à la guérison, mais, fréquemment, la mort survient vers la fin du deuxième septénaire (4 fois sur 7 inoculations).

A l'autopsie, le foie et la rate sont tuméfiés; il n'existe jamais d'ulcérations des plaques de Peyer. Le foie, la rate et les reins contiennent en culture pure le coccus de Bruce.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le micrococcus melitensis est rond ou légèrement ovale; il mesure environ 0,3 μ de diamètre. Il est immobile. Le plus souvent on l'observe à l'état isolé, quelquefois il est groupé en diplocoques et très rarement en très courtes chaînettes.

Coloration. — Le coccus se colore aisément par les solutions de couleurs basiques d'aniline; il ne prend pas le Gram.

CULTURES.

Le coccus de Bruce est aérobie; il se développe de préférence en bouillon et sur gélose ordinaire. A + 22° le développement est insignifiant; à + 25° la culture est possible mais la température optima est de + 37° environ. Le développement, toujours tardif, ne commence que plusieurs jours après l'ensemencement.

Bouillon. — Au bout de trois à quatre jours à + 37° le bouillon présente un trouble uniforme; il ne se forme pas de pellicule à la surface.

Gélose. — *Piqûre.* — Au bout de quelques jours à + 37° apparaissent autour du point piqué de petites taches d'un blanc de perle et sur le trait de piqûre de petites colonies sphériques. A la longue les colonies de la surface se réussissent pour former une rosette, le long de la piqûre les colonies se réunissent en une traînée jaune brun à contour dentelé.

Strie. — Le long de la strie, à + 37°, apparaissent vers la quatre-vingtième heure de très petites colonies atteignant 2 à 3 millimètres de diamètre; après neuf ou dix jours, les colonies sont circulaires, font légèrement saillie, leur aspect est lisse et brillant, par transparence leur centre paraît jaune, leur périphérie blanc bleuâtre; à la lumière réfléchie elles sont d'un blanc laiteux.

Gélatine. — En piqûre à + 22° le développement est nul ou insignifiant; à la surface il se forme parfois une petite colonie blanche de la grosseur d'une tête d'épingle. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Pomme de terre. — Le M. melitensis ne se développe pas sur la pomme de terre.

CHAPITRE XVIII

LE BACILLE DE L'INFLUENZA

Le bacille de l'influenza a été découvert par Pfeiffer; les travaux de Pfeiffer ont été confirmés par ceux de Weichselbaum, Huber, Borchardt, Klein, Baumler, etc.

L'influenza est une maladie exclusivement humaine; le bacille spécifique existe dans les crachats, le mucus nasal, les voies respiratoires. Dans le poumon il peut déterminer la production de foyers de broncho-pneumonie présentant des caractères histologiques spéciaux.

Le bacille de l'influenza ne se rencontre jamais ou presque jamais dans le sang; les symptômes généraux de la maladie relèvent d'une intoxication et non d'une infection généralisée. Le microbe que Canon et Bruschettini ont trouvé dans le sang des grippés diffère absolument du bacille de Pfeiffer; il est probable que Canon et Bruschettini se sont trouvés en présence d'une bactérie existant sur la peau et qui a souillé le sang au moment du prélèvement, ce microbe est un petit streptocoque poussant très bien sur les milieux ordinaires de culture et pathogène pour le lapin.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE.

Les espèces animales, sauf le singe, sont réfractaires au bacille de l'influenza. Pfeiffer a essayé sans succès l'inoculation à la souris, au rat, au cobaye, au lapin, au porc, au chat et au chien.

Chez le singe, l'inoculation d'une culture pure ou de crachats de grippés détermine une maladie analogue à l'influenza humaine et se terminant d'ordinaire par la guérison; dans un cas, après inoculation de crachats grippaux émulsionnés dans du bouillon, la mort est survenue avec des lésions pulmonaires analogues à celles de l'homme.

Le lapin succombe parfois à l'inoculation de fortes doses de cultures pures, mais chez lui le bacille ne pullule pas et l'animal suc-

combe à l'intoxication causée par la toxine injectée en même temps que le bacille : le fait que les cultures tuées par le chloroforme amènent également la mort confirme cette manière de voir. Pfeiffer n'a jamais obtenu chez les animaux autres que le singe « une multiplication des bacilles inoculés, une véritable infection ».

Le microbe de Canon et de Bruschettini est pathogène pour le lapin, mais il n'a rien de commun avec le bacille de l'influenza, aussi faut-il, une fois pour toutes, faire table rase de cette affirmation, répétée dans quelques manuels sur la foi des expériences de Bruschettini, que le bacille de Pfeiffer produit une infection, et même augmente de virulence par des passages successifs chez le lapin.

RECHERCHE ET MORPHOLOGIE.

Le bacille de la grippe existe dans les crachats et le mucus nasal; la recherche portera de préférence sur les crachats. Pfeiffer insiste sur les caractères macroscopiques de ces crachats; ils sont d'une couleur jaune verdâtre, épais et purulents, ordinairement concrétés en petites masses compactes. Le bacille siège entre les cellules de pus et à l'intérieur de celles-ci. La recherche sera faite par l'examen microscopique et par les cultures.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Prélever une petite parcelle au sein d'un crachat caractéristique et en préparer des lamelles qui seront colorées pendant dix minutes dans la fuchsine de Ziehl diluée.

Coupes. — Des coupes passant par les foyers de pneumonie grippale contiennent de nombreux bacilles; Pfeiffer conseille de les traiter de la façon suivante :

Fixer à l'alcool, monter à la celloïdine (nous préférons la paraffine; voy. page 217); colorer les coupes pendant une demi-heure dans la fuchsine de Ziehl diluée; au sortir du bain colorant les traiter par de l'alcool absolu très faiblement acidulé avec de l'acide acétique pendant quelques secondes : dès que la coloration rouge foncé des coupes a fait place à une teinte rose violet uniforme, porter celle-ci dans l'essence de girofle et le xylol, puis monter dans le baume. Sur ces préparations les bactéries sont fortement colorées en rouge sur un fond faiblement rose.

Aspect du bacille. — Le bacille de Pfeiffer se présente sous l'aspect d'un très petit bâtonnet et même d'un coccobacille : c'est la plus petite des espèces microbiennes connues. Il est isolé ou

réuni en chaînettes de deux ou quatre éléments; dans les crachats on le trouve en véritables amas; il siège quelquefois à l'intérieur des leucocytes, mais jamais dans leurs noyaux. Dans les cultures il est un peu plus volumineux que dans les crachats; quelquefois



Fig. 168. — Bacille de la grippe. — Crachats. — Fuchsine de Ziehl diluée (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).



Fig. 169. — Bacille de la grippe. — Culture sur gélose-sang. — Fuchsine de Ziehl diluée (Reich. Obj. 1/12 imm.; Oc. IV).

même il y prend la forme de minces bâtonnets à bouts arrondis. Klein insiste sur la fréquence dans les cultures de longs filaments streptobacillaires; il a observé également des formes d'involution : bacilles renflés et présentant souvent une vacuole centrale.

Le bacille de l'influenza est immobile.

Coloration. — Le bacille de l'influenza se colore assez difficilement par les couleurs basiques et ne prend pas le Gram. Le procédé de choix pour le colorer consiste à employer la fuchsine de Ziehl diluée, et il est nécessaire de laisser le colorant agir pendant une dizaine de minutes. On peut aussi utiliser de la même manière le bleu de méthylène phéniqué.

Pfeiffer a décrit sous le nom de bacille de la pseudo-influenza (*Pseudoinfluenzabacillus*) un petit bâtonnet qu'il a rencontré dans des cas de broncho-pneumonie infantile. Ce bacille qui présente les mêmes caractères de culture que le véritable bacille de l'influenza, n'est pas pathogène pour les animaux et ne diffère de ce dernier que par sa taille un peu supérieure et par la propriété de donner des filaments assez longs dans les cultures; il semble que l'on doive identifier les deux micro-organismes.

CULTURES.

Choisir un crachat bien compact, le laver plusieurs fois à l'eau distillée stérile (méthode de Kitasato ; Voy. p. 189) ; prélever purement une petite parcelle au centre du crachat lavé, l'émulsionner dans un peu de bouillon stérile et avec l'émulsion ensemencer en surface des plaques de gélose au sang préparées comme nous le dirons plus loin.

Conditions de culture. — Le bacille de Pfeiffer ne cultive pas sur les milieux ordinaires; pour se développer il exige la présence d'hémoglobine dans les milieux nutritifs ; exclusivement aérobie, il se développe de + 26^c à + 42^c, la température optima étant + 37^c.

Quand on ensemence sur de la gélose ordinaire une émulsion de crachats préparée comme nous venons de le dire on obtient d'ordinaire une culture grêle, mais les réensemencements de cette culture sur gélose restent stériles ; le crachat avait apporté en petite quantité les matières nécessaires au développement de la première culture.

Gélose au sang. — La gélose additionnée de sang constitue le milieu le plus favorable à la culture du bacille de Pfeiffer. Pour la préparer on coule de la gélose liquéfiée dans une boîte de Petri et après refroidissement on dépose à la surface du milieu nutritif une grosse goutte de sang que l'on étale en couche aussi mince que possible. Le sang humain et le sang de pigeon recueillis aseptiquement donnent les meilleurs résultats.

L'ensemencement en surface d'une émulsion de crachats donne lieu, dès la vingt-quatrième heure à 37^c, à un développement abondant de petites colonies très fines ne pouvant guère être vues qu'à la loupe, jamais confluentes et ayant l'aspect de gouttelettes transparentes. De très rares colonies peuvent atteindre les dimensions d'une tête d'épingle.

Pfeiffer, en réensemençant ces colonies sur des tubes de gélose inclinée recouverte d'une mince couche de sang a pu obtenir pendant plusieurs mois des passages successifs.

Gélose à l'hémoglobine. — Pfeiffer ayant démontré que, dans le sang, c'est l'hémoglobine qui favorise le développement du bacille de l'influenza, Huber a proposé de remplacer dans les cultures le sang par de l'hémoglobine ; il a obtenu ainsi des cultures analogues à celle que nous venons de décrire.

Huber utilise l'hémoglobine commerciale du Dr Hommels ; ce liquide de couleur rouge foncé est additionné de potasse jusqu'à réaction

fortement alcaline (pour éviter la coagulation pendant le chauffage), puis stérilisé à 100°. Le produit obtenu est mélangé à de la gélose stérile liquéfiée et refroidi à +50° ou +60°, en quantité suffisante pour que celle-ci prenne une teinte rouge groseille; on incline les tubes et on les laisse se solidifier.

Gélose à l'œuf. — Nastikow recommande le milieu suivant :

Gélose	15 à 20	grammes.
Jaune d'œuf	100	—
Eau	1000	—
Soude	5	—

Bouillon-sang. — Dans le bouillon additionné de sang de pigeon le bacille de la grippe se développe en produisant de légers flocons blanchâtres peu caractéristiques.

Gélose glycérinée. — Kitasato avait avancé que le bacille de la grippe cultive sur la gélose glycérinée, mais le microbe qu'il avait entre les mains était un très fin streptocoque n'ayant rien de commun avec le bacille de Pfeiffer. Il en est de même des bactéries de Bruschettini et de Canon.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Le bacille de l'influenza est très sensible à l'action de la chaleur et de la dessiccation. En milieu humide, dans les crachats préservés de la dessiccation, par exemple, il peut garder son activité pendant quatorze jours; au contraire des crachats ensemencés après une dessiccation de trente-six à quarante heures à la température ordinaire ne donnent pas de culture.

Sur la gélose au sang le bacille vit de seize à dix-huit jours, et trente-huit à quarante jours, d'après Huber, sur la gélose à l'hémoglobine. La dessiccation tue les cultures en deux heures à 37°, et en vingt-quatre heures à la température ordinaire.

Infections secondaires. — Chez les malades atteints d'influenza un grand nombre de microbes peuvent se développer à côté du bacille de Pfeiffer et créer des complications de la maladie primitive; le streptocoque et le pneumocoque jouent le plus grand rôle dans ces infections secondaires, on a aussi rencontré les staphylocoques et le colibaccille.

CHAPITRE XIX

LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE

Le bacille de Koch est l'agent de la tuberculose de l'homme et des animaux. L'opinion de Straus et Gamaléia attribuant la tuberculose aviaire à un microbe spécial, constituant une espèce à côté du bacille de Koch, est abandonnée aujourd'hui, et comme le soutiennent depuis longtemps Arloing, Dor et Courmont, on admet que le bacille de la tuberculose aviaire n'est qu'une variété ou une race du bacille de la tuberculose des mammifères. Nous ne séparerons pas la description de chacun de ces microbes, nous nous bornerons à mettre en lumière dans chaque paragraphe les différences qui les séparent.

TUBERCULOSE HUMAINE.

Le bacille de Koch se rencontre dans toutes les manifestations de la tuberculose de l'homme, quel que soit le siège de ces manifestations.

On a voulu opposer à la tuberculose des viscères, des séreuses pleurales et abdominales, celle qui affecte la peau, les ganglions, les articulations, etc., et d'après Arloing ces *tuberculoses chirurgicales* seraient dues à un bacille atténué constituant une race ; il y a plutôt lieu d'admettre que le bacille conserve sa pleine virulence dans ces tuberculoses locales et que leur peu de tendance à l'extension résulte de causes telles que la résistance particulière de l'organisme envahi, l'influence du lieu où se produit la culture, le petit nombre des microbes envahisseurs qui se développent mal dans un terrain peu favorable.

L'homme contracte la tuberculose par les voies respiratoires ou digestives, plus rarement par la voie génitale ou cutanée.

TUBERCULOSE DES ANIMAUX.

La plupart des espèces domestiques sont réceptives à la tuberculose.

Bovidés. — Les bovidés adultes sont fréquemment tuberculeux

(3 à 60 p. 100 suivant les régions); les veaux sont très rarement tuberculeux (1 p. 10000 au plus).

Le plus souvent, dans la tuberculose du bœuf, la maladie a une marche chronique; l'animal tuberculeux peut conserver longtemps son embonpoint; les voies respiratoires sont seules atteintes; on trouve dans les poumons des masses volumineuses (*pommelière*) parfois infiltrées de sels calcaires; les plèvres et surtout les ganglions bronchiques sont atteints en même temps; parfois les lésions envahissent l'abdomen, les ganglions mésentériques, le foie, plus rarement la rate et les reins.

Quelquefois la tuberculose se localise exclusivement sur les voies digestives : les organes lymphoïdes de l'intestin, les ganglions, le péritoine, le foie et la rate sont envahis. On peut encore rencontrer chez les bovidés d'autres manifestations locales, telle que la tuberculose mammaire (environ 1 fois sur 100 animaux tuberculeux), des tuberculoses osseuses, etc.

Enfin la tuberculose bovine peut se présenter sous la forme d'une infection générale à marche rapide rappelant la granulie de l'homme.

Singe. — Dans nos climats, le singe devient fréquemment tuberculeux; la tuberculose du singe évolue d'une façon analogue à la tuberculose humaine; elle est remarquable par sa tendance à la généralisation; la tuberculose pulmonaire est la forme la plus fréquente.

Chien. — Le chien est assez souvent tuberculeux (Cadiot); longtemps la tuberculose du chien a été méconnue : chez cet animal, les lésions prennent fréquemment l'aspect de productions cancéreuses et on les considérait comme des néoplasmes; quelquefois cependant, on rencontre chez le chien des lésions analogues à celles de l'homme et particulièrement des cavernes pulmonaires.

Porc. — Un à 10 p. 1000 des porcs tués dans les abattoirs sont tuberculeux.

La tuberculose du porc atteint d'ordinaire les voies digestives ; on a signalé chez le porc des otites tuberculeuses, probablement secondaires à des lésions du pharynx propagées par la trompe d'Eustache. Les tuberculoses respiratoires et locales (cerveau, mamelle, etc.) sont rares ; on signale des formes à évolution rapide analogues à la granulie de l'homme.

Lapin. — Il y a lieu d'en appeler de l'aphorisme si souvent cité : « Le lapin est follement tuberculeux. » La tuberculose spontanée est plutôt rare chez le lapin ; elle revêt la forme pulmonaire.

Chèvre et mouton. — La chèvre et le mouton peuvent contracter la tuberculose ; cette affection, pour être rare chez ces animaux, n'est point exceptionnelle.

Cheval. — La tuberculose est rare chez le cheval; la forme abdominale est la plus fréquente ; plus rarement on observe les formes pulmonaires : granulie, infiltration diffuse, tumeurs volumineuses d'apparence sarcomateuse.

Chats. — Le chat est rarement tuberculeux; les lésions affectent chez lui les mêmes formes que chez le chien; les localisations intestinales sont les plus fréquentes.

Oiseaux. — Les oiseaux, poules, faisans, pintades, perdrix, paons, perroquets, sont très fréquemment tuberculeux.

Les oiseaux s'inoculent d'ordinaire par l'intestin en ingérant des crachats humains ou des déjections d'animaux tuberculeux: le foie et la rate sont le siège de prédilection des tubercules; rarement, on observe des lésions pulmonaires; le poumon peut cependant être envahi à la dernière période de la maladie; on rencontre rarement, sauf chez le perroquet, des tuberculoses de la peau, des muqueuses et des articulations.

L'aspect histologique des lésions tuberculeuses aviaires diffère de celui des tubercules des mammifères; cet aspect varie d'ailleurs d'une espèce à l'autre; fréquemment, on trouve une infiltration des viscères par les bacilles sans tubercules apparents.

Reptiles et Batraciens. — On a signalé des lésions tuberculeuses chez un certain nombre de reptiles et de batraciens: le boa et le python, la couleuvre à collier, la grenouille.

TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE.

On pratique d'ordinaire les inoculations chez le cobaye et le lapin, animaux très réceptifs et que l'on se procure aisément; l'inoculation est pratiquée, soit à l'aide des cultures pures délayées dans un peu d'eau stérile, soit à l'aide de produits tuberculeux (pus, crachats, fragments de tissus, etc.), également broyés avec quelques gouttes d'eau ou insérés en nature sous la peau (crachats, pus, tissus), ou dans le péritoine (tissus).

Cobaye. — Le cobaye est le réactif biologique de la tuberculose; tout cobaye inoculé avec une substance contenant des bacilles, même en petit nombre, prend la tuberculose.

Inoculation sous-cutanée. — Après une dizaine de jours, il se forme, au lieu d'inoculation, un petit nodule induré, puis le nodule se ramollit et s'abcède; l'abcès s'ouvre au dehors et il s'établit un petit ulcère: le *chancre tuberculeux*. En même temps, les ganglions voisins se tuméfient; l'animal maigrit, se cachectise et la mort survient au bout de 1 à 3 mois. A l'autopsie, les lésions de la rate et du foie dominent; la rate est volumineuse, ocreuse, semée de tubercules caséeux et de granulations jaunes plus récentes; les masses caséeuses peuvent confluer pour former des masses irrégulières, mamelonnées, blanc jaunâtre; le foie présente des lésions analogues, mais en général moins marquées. Sur les séreuses, à

la surface des poumons, des reins, apparaît un fin semis de granulations miliaires. Les ganglions lymphatiques avoisinant la lésion d'inoculation sont caséeux. En sacrifiant l'animal, quinze à vingt jours après l'inoculation, on trouve déjà des lésions caractéristiques, et particulièrement les tubercules de la rate et du foie.



Fig. 170. — Follicule tuberculeux; stade de début (demi-schématique).

Ce tableau symptomatique a été décrit pour la première fois par Villemin, d'où le nom de « type Villemin », sous lequel on désigne cette forme de généralisation tuberculeuse.

Inoculation intrapéritonéale. — L'évolution se fait suivant le type précédent, mais est plus rapide. La mort, précédée par cet amaigrissement, une cachexie progressive, survient en deux à six semaines. Les viscères présentent les mêmes lésions que dans le cas précédent; la lésion chancreuse n'existe pas, mais le péritoine est infiltré de tubercules et forme une masse compacte, caséeuse. Les ganglions mésentériques et inguinaux ont subi la dégénérescence caséeuse.

L'injection intrapéritonéale d'une dose considérable de cultures de la tuberculose humaine tue le cobaye en quelques jours ; à l'autopsie, on constate un épanchement séreux dans les plèvres, mais on ne trouve pas de tubercules visibles dans les organes (Koch, Straus et Gamaléia).

Inoculation intrapulmonaire. — Au niveau du point de pénétration de l'aiguille, il se produit un foyer de caséification ; aux alentours, les poumons sont envahis par des granulations grises. Les viscères abdominaux présentent les mêmes lésions que dans l'inoculation sous-cutanée.

Inhalation. — Les cobayes prennent aisément la tuberculose quand on les fait respirer dans une atmosphère chargée de crachats desséchés et finement pulvérisés ou de poussières mêlées à des cultures du bacille de Koch ; l'animal succombe avec des lésions pulmonaires très prononcées affectant le type de la broncho-pneumonie caséeuse.

Ingestion. — Villemin et Parrot, Klebs ont rendu des cobayes tuber-

culeux en les nourrissant avec le lait provenant d'une vache phtisique ; les lésions de l'intestin ne se rencontrent pas fatalement chez les animaux ainsi infectés.

Lapin. — Le lapin est moins sensible à la tuberculose que le cobaye ; il ne se tuberculise pas fatalement après l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité d'un produit tuberculeux; quelquefois encore, la lésion locale dure fort longtemps avant que la généralisation ne se produise.

Inoculation sous-cutanée. — La mort survient en un ou plusieurs mois, suivant la quantité de virus inoculé; on observe le chancre local et toutes les lésions du type Villemin.

Inoculation intrapéritonéale. — La mort survient plus rapidement : on observe une éruption tuberculeuse sur le péritoine, la rate, le foie, etc. ; la mort arrive souvent avant que les tubercules aient eu le temps d'envahir les organes thoraciques.

Inoculation intrapulmonaire. Inhalation. — Mêmes lésions et même marche que chez le cobaye. Par l'inoculation trachéale, Fraenkel et Troje ont produit chez le lapin la pneumonie caséeuse.

Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil. — Ce mode d'inoculation permet de suivre facilement l'évolution des lésions tuberculeuses. Au cours du 3e septénaire, l'iris se couvre de granulations tuberculeuses, puis l'œil se tuméfie, l'humeur aqueuse se trouble; quelquefois il se produit une fonte purulente de l'œil; les ganglions du cou s'hypertrophient et la tuberculose se généralise suivant le type Villemin.

Inoculation intraveineuse. — L'infection qui succède à ce mode d'inoculation peut affecter deux types :

a) *Granulie.* — La mort survient en deux ou trois semaines selon la dose injectée; les viscères et les séreuses sont couverts d'un semis de granulations jeunes.

b) *Type Yersin.* — La mort survient en douze ou vingt-cinq jours; les animaux maigrissent et se cachectisent rapidement; la température est très élevée. A l'autopsie, on trouve comme lésion unique une hypertrophie considérable de la rate et du foie; il n'existe aucun tubercule apparent ; le foie, la rate, la moelle des os contiennent en abondance le bacille tuberculeux.

Straus et Gamaléia ont soutenu que le type Yersin était le mode d'évolution caractéristique de l'infection sanguine par le bacille aviaire; mais de nombreux faits de Yersin, Nocard, Courmont et Dor, Sanchez Toledo, Cadiot, Gilbert et Roger, etc., prouvent que l'inoculation intraveineuse du bacille humain est susceptible de produire le type Yersin. — Grancher et Ledoux-Lebard obtiennent à

volonté chez le lapin le type Yersin ou la granulie selon qu'ils injectent une dose massive ou une dose minime de virus.

D'une façon générale, cependant, le bacille aviaire injecté dans les veines du lapin ou du cobaye produit une simple infiltration tuberculeuse des organes sans formation de tubercules visibles.

Chien. — Le chien est facilement infecté par le bacille humain; il est beaucoup plus résistant vis-à-vis du bacille aviaire, mais ne jouit cependant pas d'une immunité complète vis-à-vis de ce bacille (Grancher et Héricourt).

Inoculation sous-cutanée. — Ce mode d'inoculation n'entraîne pas fatalement la mort; la tuberculose peut rester localisée ou se généraliser.

Inoculation intrapéritonéale. — La mort survient au bout de deux à trois mois après l'inoculation d'une culture pure dans le péritoine; il se produit une péritonite tuberculeuse avec épanchement, formation de fausses membranes, agglutination des anses intestinales, envahissement des ganglions, puis l'infection se généralise.

Inoculation intraveineuse. — La mort arrive un ou deux mois après l'inoculation d'un quart de centimètre cube d'une émulsion épaisse de culture sur gélose glycérinée dans une veine; les lésions pulmonaires dominent; le foie, la rate, etc., peuvent également contenir des tubercules.

Inhalation. — Tappeiner a montré que l'on peut rendre les chiens tuberculeux en les faisant respirer dans une atmosphère chargée de crachats tuberculeux desséchés et pulvérisés, les lésions siègent dans les poumons, la rate et les reins.

Oiseaux. — Les partisans de la dualité des tuberculoses humaine et aviaire ont soutenu que la poule n'était pas réceptive pour le bacille humain; cette opinion ne saurait plus être admise aujourd'hui après les expériences de Koch, de Nocard et de Cadiot, Gilbert et Roger; ces expérimentateurs ont observé des tubercules chez la poule à la suite de l'ingestion ou de l'inoculation de produits tuberculeux provenant de l'homme ou de cultures pures du bacille humain.

L'injection intraveineuse du virus aviaire entraîne la mort de la poule en quinze à vingt jours avec production d'une tuberculose du type Yersin.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Les mêmes caractères appartiennent au bacille humain et au bacille aviaire.

Le bacille tuberculeux, dans les cultures, se présente sous l'aspect de petits bâtonnets très fins, toujours immobiles. Dans les cultures sur milieux solides, ces bacilles se groupent en amas allongés sinueux rappelant l'aspect de moustaches par suite de l'enchevêtrement régulier et dans le même sens des bacilles; on rend cette disposition

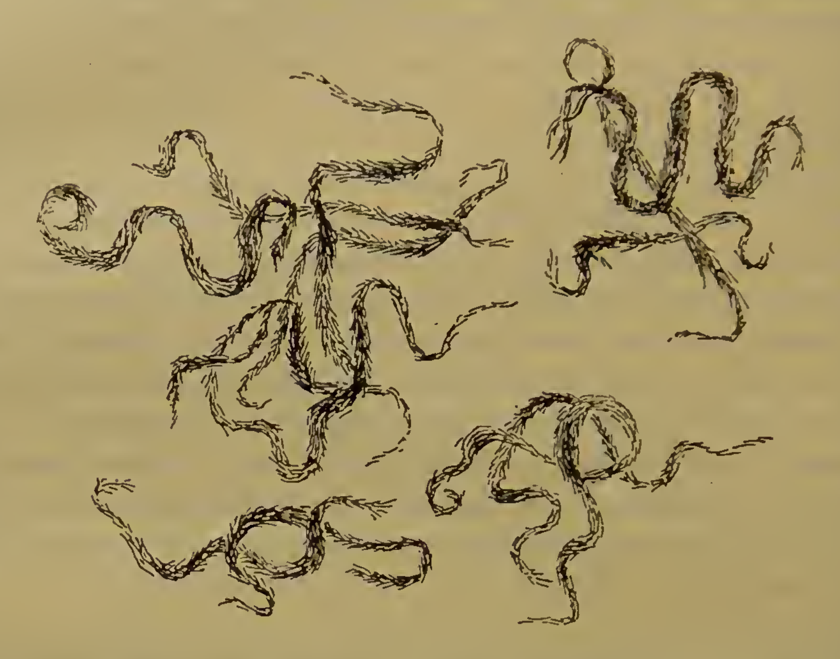


Fig. 171. — Préparation par impression de bacille tuberculeux. 700/1 (d'après Koch).

très visible en appliquant une lamelle à la surface d'une culture sur gélose glycérinée, et l'y appuyant légèrement, puis en la retirant sans exercer de frottement; on fixe alors les lamelles par la chaleur, on colore par un des procédés indiqués ci-dessous et on examine avec l'objectif à immersion; la figure 171 reproduit l'aspect de la préparation obtenue.

Le bacille de la tuberculose, pour être vu dans les humeurs et les tissus, exige une coloration préalable : nous devons apprendre à le colorer avant que d'en étudier les caractères.

COLORATION.

L'étude du bacille de Koch exige l'emploi de méthodes spéciales de coloration, méthodes qui permettent non seulement de mettre le bacille en évidence dans les tumeurs et les tissus, mais encore de le caractériser.

Le bacille de Koch se colore difficilement par les couleurs basiques d'aniline, mais une fois qu'il est coloré, il retient énergiquement la substance colorante, même quand on l'expose à l'action de décolorants éner-

giques tels que les acides minéraux dilués. Un seul bacille pathogène, le bacille de la lèpre, partage cette propriété avec le bacille de Koch, mais nous verrons qu'il est aisé de différencier ces deux microbes.

Un grand nombre de procédés de coloration ont été proposés pour la recherche du bacille de Koch : tous ils sont basés sur le même principe que nous venons de poser. Nous devons exposer ici les procédés dont l'usage est le plus fréquent, mais nous ne saurions trop insister sur la nécessité pour les commençants d'adopter un procédé unique, procédé qu'ils connaîtront à fond et sur les résultats duquel ils pourront compter; toutes nos préférences vont au procédé de Ziehl-Nelsen.

I. — PROCÉDÉS APPLICABLES AUX FROTTIS.

Procédé de Ziehl-Nelsen.

Procédé recommandé.

Principe. — Étant donné un frottis que l'on a coloré par la fuchsine phéniquée, si on le traite par un acide minéral dilué, le fond et tous les microbes, sauf celui de la tuberculose, se décolorent, le bacille tuberculeux reste coloré en rouge; si on fait alors agir une solution aqueuse de bleu de méthylène sur la préparation, le fond et les bacilles incolores se teintent en bleu, le bacille tuberculeux restant rouge.

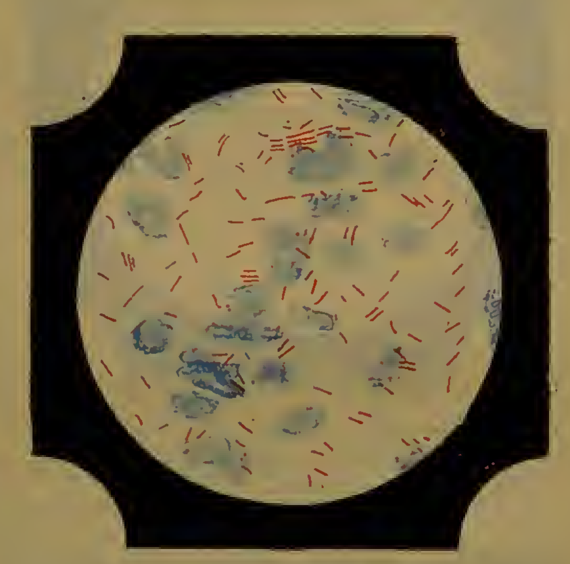


Fig. 172. — Bacille tuberculeux dans les crachats. Méthode de Ziehl, double coloration (Reich. obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Opération. — 1° Sur la lamelle séchée et fixée comme à l'ordinaire et tenue par un de ses angles avec la pince de Cornet, on dépose une grosse goutte de fuchsine de Ziehl. On porte la lamelle sur une petite flamme (veilleuse du bec Bunsen), et on chauffe très doucement, jusqu'à production de vapeurs, pendant environ deux minutes, en évitant d'atteindre l'ébullition et en veillant à ce que la solution colorante ne se dessèche pas sur la lamelle.

2° Rejeter la solution colorante et la remplacer par quelques gouttes d'acide azotique au tiers (eau distillée, 2 volumes; acide azo-

tique pur 1 volume) ou d'acide sulfurique au quart (eau distillée 3 volumes; acide sulfurique pur 1 volume). Laisser en contact quelques secondes; la préparation devient jaunâtre.

3° Laver alors à grande eau, une légère teinte rose reparaît. La lamelle doit être colorée en rose pâle; si la décoloration n'était pas suffisante, on ferait alors agir de nouveau la solution acide.

4° Après le lavage à l'eau, verser sur la préparation quelques gouttes d'alcool absolu pour achever la décoloration; après action de l'alcool, la teinte rose doit être très faible, à peine visible.

Ce temps permet de pousser très loin la décoloration, sans avoir à redouter l'action trop énergique de l'acide qui, à la longue, décolorerait même les bacilles tuberculeux; de plus, l'action de l'alcool permet d'éliminer le *bacille du smegma* qui reste coloré dans les mêmes conditions après l'action de la solution acide.

5° Laver à grande eau.

6° Déposer sur la préparation un peu de solution aqueuse de bleu de méthylène; laisser quelques instants en contact.

7° Laver à l'eau; sécher; monter au baume.

Fig. 173. — Bacille tuberculeux dans les crachats. Méthode de Ziehl; simple coloration (Reich. obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Remarque. — Quand on fait simplement la recherche du bacille tuberculeux, il y a grand avantage à ne pas recolorer le fond après l'action de l'alcool: les bacilles apparaissant en rouge foncé sur le fond incolore ou à peine rose sont beaucoup plus visibles.

On arrête l'opération au temps 3 inclus; la préparation est examinée dans l'eau; si, après examen, on la juge bonne à conserver, on peut la soumettre à l'action du bleu de méthylène et terminer comme il est dit plus haut.

Cette simplification est surtout utile quand les bacilles sont peu nombreux dans la préparation; les débutants tireront un grand profit de son emploi; en tous cas, elle rend la recherche plus rapide.

Procédé de Gabbé.

Le procédé de Gabbé n'est qu'une modification de celui de Ziehl, mais est beaucoup moins sûr et plus délicat à manier que ce dernier.

1° Colorer à la fuchsine phéniquée comme dans le procédé précédent.

2° Opérer à la fois la décoloration et la recoloration du fond en plongeant la lamelle pendant une minute dans la solution suivante :

Bleu de méthylène	2 grammes.
Acide sulfurique au quart	100 centimètres cubes.

3° Laver, sécher, monter.

Nous n'insisterons pas sur les procédés de Stocquart et de Pithion et G. Roux (de Lyon), qui ne sont que des modifications sans intérêt du procédé de Gabbé.

Procédé d'Ehrlich.

1° Colorer la lamelle à chaud pendant cinq minutes avec le violet aniliné (p. 141).

Cette coloration peut se faire en déposant une goutte de matière colorante sur la lamelle et en chauffant sur la veilleuse à gaz ou en plongeant la lamelle dans une petite capsule contenant la solution et que l'on chauffe jusqu'à production de vapeurs.

2° Décolorer pendant quelques secondes à l'acide nitrique au tiers.

3° Laver ; achever la décoloration à l'alcool absolu.

4° Colorer pendant quelques instants à froid dans une solution aqueuse saturée de vésuvine.

5° Laver, sécher, monter.

Les bacilles tuberculeux sont colorés en violet, le fond est teinté en brun par la vésuvine.

Procédé de Fraenkel.

1° Colorer les lamelles à chaud pendant cinq minutes avec la fuchsine anilinée (préparée comme le violet aniliné en remplaçant la solution alcoolique de violet de gentiane par la même solution de fuchsine).

2° Au sortir de la fuchsine anilinée, colorer les lamelles pendant une minute dans la solution suivante :

Alcool à 90°	50 centimètres cubes.
Eau d'aniline	30 —
Acide azotique	20 —
Solution alcoolisée saturée de bleu de méthylène	Q. S.

pour obtenir une teinte bleue intense.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Sécher et monter.

Procédé d'Herman.

Préparer les solutions suivantes :

A	Krystal violet	1 gramme.
	Alcool à 90°	30 centimètres cubes.
B	Carbonate d'ammoniaque	1 gramme.
	Eau distillée	100 centimètres cubes.

Au moment du besoin, verser dans une petite capsule quelques centimètres cubes de solution B, y ajouter de la solution A en quantité suffisante pour qu'une goutte du mélange déposée sur du papier à filtrer y laisse une teinte très foncée.

1° Chauffer le bain colorant jusqu'à ébullition commençante et y plonger les lamelles pendant une minute.

2° Porter les lamelles pendant quatre à cinq secondes dans une solution d'acide nitrique au dixième.

3° Laver à l'alcool absolu pour achever la décoloration.

4° Porter les lamelles pendant trente secondes dans la solution suivante :

Éosine	1 gramme.
Alcool à 60°	100 centimètres cubes.

5° Laver très rapidement à l'alcool ; sécher ; monter.

Les bacilles tuberculeux sont colorés en violet ; le fond est teint par l'éosine.

Procédé de Lustgarten modifié.

En modifiant légèrement la méthode indiquée par Lustgarten pour la coloration du prétendu bacille de la syphilis, Sabouraud a obtenu un procédé qu'il déclare être d'une extrême sensibilité pour la recherche du bacille tuberculeux. On opérera de la manière suivante :

1° Colorer la lamelle à froid pendant une à deux heures ou à + 50° pendant quinze minutes avec le liquide de Ziehl.

2° Faire agir sur la lamelle pendant une à trois secondes une solution de permanganate de potasse à 1,5 p. 100.

3° Plonger immédiatement la lamelle dans une solution aqueuse fraîche et saturée d'acide sulfureux, pendant quelques secondes jusqu'à décoloration.

On obtient aisément la solution d'acide sulfureux, au moment même du besoin, en faisant barboter dans l'eau distillée le gaz qui se dégage d'un siphon d'acide sulfureux liquéfié, tel qu'on en trouve dans le commerce.

4° Laver à l'eau.

5° Colorer le fond pendant une à trois minutes avec la solution aqueuse de bleu de méthylène.

6° Laver à l'eau; sécher, monter dans le baume.

Procédé de Koch.

Ce procédé, le premier employé pour la recherche du bacille tuberculeux, a surtout un intérêt historique.

1° Laisser séjourner les lamelles pendant un jour à la température ordinaire ou pendant quelques heures à +45 ou 50° dans le bain suivant :

Solution alcoolique saturée de bleu de méthylène.	1	centimètre cube.
Solution aqueuse de potasse à 10 p. 100..........	2	—
Eau distillée..................................	200	—

2° Plonger les lamelles dans une solution aqueuse saturée de vésuvine; au bout d'un quart d'heure environ, une teinte brune se substitue à la coloration bleue primitive, sauf en ce qui concerne les bacilles tuberculeux qui conservent leur teinte bleue.

II. — PROCÉDÉS APPLICABLES AUX COUPES.

Toutes les méthodes que nous venons d'indiquer peuvent s'appliquer, après légères modifications, à la coloration des coupes; la particularité capitale est que *la coloration doit toujours être faite à froid.*

Procédé de Ziehl-Nelsen.

Procédé recommandé.

1° Colorer la coupe par un séjour d'un quart d'heure dans la fuchsine de Ziehl à froid.

2° Faire agir pendant quelques secondes la solution acide; laver.

3° Achever la décoloration par l'alcool absolu jusqu'à ce que la coupe n'ait plus qu'une teinte rose pâle. Laver.

4° Colorer le fond avec la solution aqueuse de bleu de méthylène. Laver.

5° Faire agir rapidement l'alcool absolu, puis l'essence de girofle et le xylol, monter au baume.

Procédé de Kühne.

Procédé recommandé.

Ce procédé inédit de Kühne a été rapporté par Borrel ; il est fort à recommander, en particulier, pour la coloration des coupes du

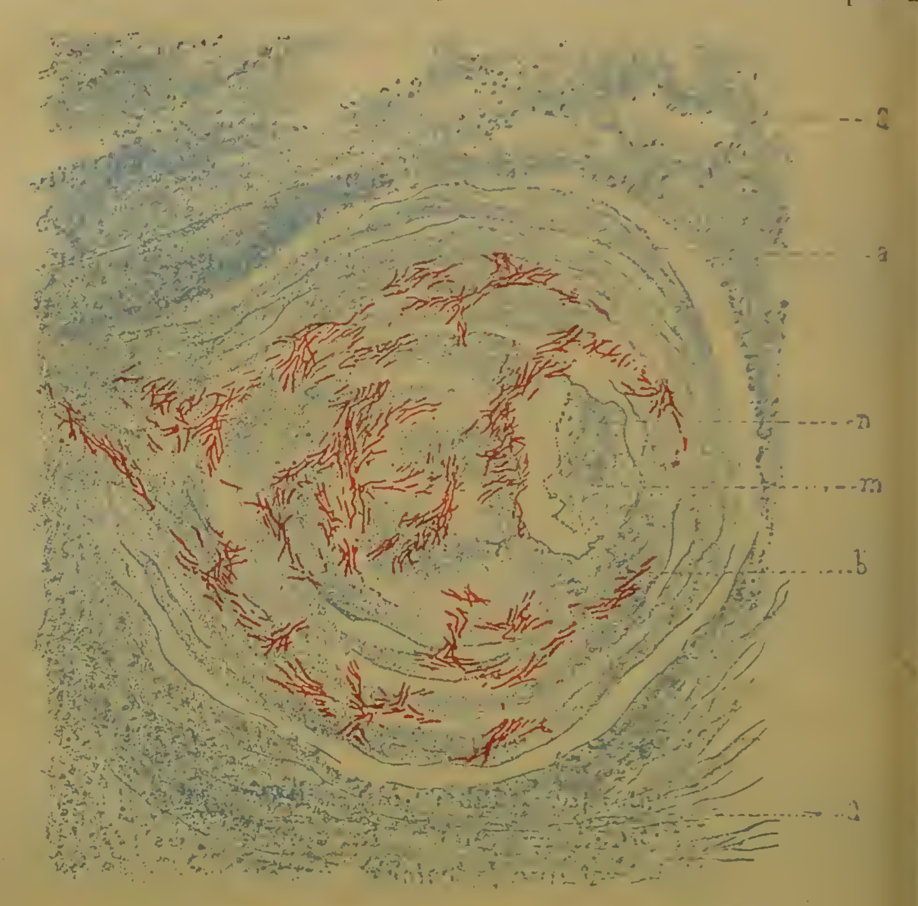


Fig. 174. — Tubercule fibreux du poumon. Méthode de Ziehl-Nelsen.

poumon. L'action du chlorhydrate d'aniline est moins brutale que celle des acides minéraux et n'altère en rien la disposition et la forme des cellules.

1° Faire agir sur la coupe l'hématoxyline de Bœhmer ou l'hématéine (p. 223 et 224) pendant deux minutes pour colorer les noyaux des cellules. Laver à l'eau distillée.

2° Colorer quinze minutes à froid dans la fuchsine de Zielh.

3° Faire agir sur la coupe pendant quelques secondes une solution aqueuse à 2 p. 100 de chlorhydrate d'aniline.

4° Décolorer à l'alcool absolu.

Après cette décoloration, les cellules de fond sont incolores (sauf les noyaux) ; on peut faire agir la solution aqueuse de jaune d'aurantia qui

colore en particulier les globules sanguins; après l'action de l'aurantia, on déshydrate par l'alcool absolu.

5° Éclaircir par l'essence de girofle, le xylol et monter dans le baume.

Procédé d'Ehrlich.

1° Colorer à froid pendant douze heures dans le violet de gentiane aniliné.

2° Décolorer pendant quelques secondes avec l'acide nitrique au tiers. Laver.

3° Achever la décoloration à l'alcool absolu.

4° Faire agir pendant quelques minutes une solution aqueuse saturée de vésuvine.

5° Déshydrater rapidement à l'alcool absolu.

6° Éclaircir par l'essence de girofle, le xylol. Monter dans le baume.

Procédé de Letulle.

1° Colorer les noyaux à l'hématoxyline, comme dans le procédé de Kühne. Laver à l'eau distillée.

2° Faire agir pendant quinze minutes la fuchsine de Ziehl à froid. Laver rapidement à l'eau distillée.

3° Laver pendant trente secondes à l'alcool absolu.

4° Faire agir pendant cinq minutes la solution suivante :

Vert d'iode....................................	1 gramme.
Eau phéniquée à 20 p. 100......................	100 centimètres cubes.

5° Décolorer à l'alcool absolu.

6° Éclaircir à l'essence de girofle, au xyol. Monter dans le baume.

Le fond est teint en gris lilas très faible, les noyaux sont colorés en violet, les bacilles en rouge foncé. Cette méthode est applicable aux pièces durcies dans le liquide de Müller.

Procédé de Lustgarten modifié.

1° Colorer à froid pendant quelques heures dans la fuchsine phéniquée.

2°, 3°, 4°, 5° Opérer comme il a été dit à propos des lamelles.

6° Laver à l'eau ; déshydrater rapidement à l'alcool absolu.

7° Éclaircir à l'essence de girofle, au xylol et monter dans le baume.

Cette méthode est applicable à la recherche, souvent délicate, des bacilles dans le foie ; elle est applicable aux pièces durcies par le liquide de Müller.

ASPECT DU BACILLE APRÈS COLORATION.

Dans les préparations colorées, les bacilles tuberculeux ont une longueur variant entre 2 et 6 μ, leur largeur étant comprise entre 0,3 et 0,5 μ; leur diamètre transversal est d'ordinaire uniforme sur toute leur longueur; tantôt ils paraissent homogènes, tantôt, au contraire, ils sont parsemés d'espaces clairs qui les font paraître composés d'une série de petits grains ovoïdes ou arrondis. Ils sont quelquefois droits, mais plus souvent ils présentent une légère inflexion en S ou sont recourbés à une de leurs extrémités.

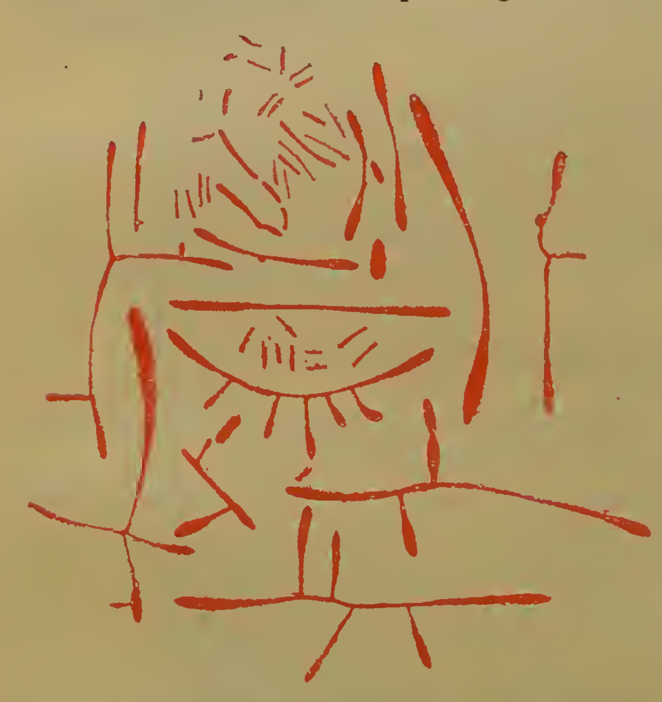


Fig. 175. — Bacilles de la tuberculose ; formes anormales ramifiées et renflées (d'après Metchnikoff).

Dans les crachats et les tissus tuberculeux, les bacilles sont isolés ou réunis par groupes dont les éléments peuvent être parallèles; quelquefois encore deux bacilles se croisent à angle plus ou moins aigu ou sont réunis à angle par une de leurs extrémités.

Koch considérait comme des spores les espaces clairs que présentent quelquefois les bacilles; cette interprétation n'est plus admise aujourd'hui; on tend plutôt à considérer comme des spores certaines granulations fortement colorées qui siègent à l'extrémité ou dans la continuité de certains bacilles (Babès, Ehrlich).

Dans les cultures, on trouve quelquefois des bacilles excessivement courts; dans d'autres cas, et particulièrement dans les cultures âgées, on rencontre des bacilles volumineux ramifiés, souvent terminés par un renflement en massue (fig. 175); ce sont là des formes d'involution (Metchnikoff, Roux et Nocard).

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille de Koch cultive sur un nombre limité de milieux; il se développe sur les milieux à base de

sérum (Koch) ou de glycérine (Nocard et Roux), à l'exclusion des milieux ordinaires.

Le bacille de Koch est aérobie et ne cultive qu'à partir de + 30° ; la culture s'arrête à 41° pour le bacille humain et seulement à 44°-45° pour le bacille aviaire. La température eugénésique est de 37-38°.

Il faut prendre certaines précautions pour ensemencer le bacille de Koch ; de préférence, on empruntera la semence à de la matière tuberculeuse provenant d'un cobaye ou d'un lapin (le bacille prélevé directement chez l'homme pousse mal sur les milieux artificiels). Cette matière tuberculeuse doit, au préalable, être broyée avec soin dans un verre stérile avec un agitateur également stérile, puis, avec l'öse forte, on porte une certaine quantité du produit broyé à la surface du sérum solidifié (il est préférable, avant solidification, d'utiliser le sérum additionné de 4 p. 100 de glycérine).

L'ensemencement doit être fait avec soin ; il ne faut pas craindre d'écorcher légèrement avec l'öse la surface du milieu de culture; il est nécessaire d'ensemencer un grand nombre de tubes, beaucoup d'ensemencements restant stériles. Le développement ne commence que vers le douzième jour d'exposition à 37-38° ; la culture n'est achevée que vers la fin de la quatrième semaine. Dès que les colonies apparaissent, il faut placer sur l'orifice de chaque tube un capuchon de caoutchouc pour éviter la dessiccation du milieu e culture.

Les cultures ainsi obtenues fourniront les matériaux pour l'ensemencement sur les divers milieux; toujours, il faut avoir soin de prendre beaucoup de semence et d'ensemencer plusieurs tubes.

Sérum solidifié. — *Bacille humain.* — Le long de la strie, apparaît vers le douzième jour à 37-38°, un semis de petites colonies blanches, arrondies, d'aspect sec, écailleux ; puis ces colonies deviennent saillantes, leurs bords sont irréguliers, l'aspect écailleux persiste. — En général, et particulièrement dans les cultures ensemencées avec des produits tuberculeux provenant de l'animal, ces colonies ne deviennent pas confluentes; au bout de trois à quatre passages cependant, elles peuvent se réunir en une membrane sèche et rugueuse.

Bacille aviaire. — Le bacille aviaire donne sur sérum une couche plus abondante que le bacille humain; la culture est épaisse et a d'ordinaire un aspect humide et gras.

Gélose glycérinée. — La gélose glycérinée constitue le milieu le plus favorable à la culture du bacille de Koch, sauf pour la première culture pour laquelle il est préférable d'employer le sérum

glycériné. Il y a avantage à ajouter un peu de glucose à la gélose glycérinée (p. 42).

Bacille humain. — La culture débute comme sur le sérum, mais les colonies sont plus nombreuses, plus volumineuses; elles deviennent rapidement confluentes et forment une nappe épaisse, blanchâtre, sèche, rude, écailleuse, mamelonnée, lors des premières cultures, mais au bout de quelques passages sur gélose glycérinée, les cultures deviennent très abondantes, humides, grasses et plissées. Les cultures de tuberculose prennent en vieillissant une teinte rosée; elles dégagent une odeur suave caractéristique.

Bacille aviaire. — On a voulu opposer la culture sur gélose du bacille aviaire à celle du bacille humain: le bacille humain donne, disait-on, une culture sèche et rugueuse, le bacille aviaire une culture humide et grasse; nous venons de voir que le bacille humain donne fréquemment des cultures abondantes, humides et grasses; de son côté le bacille aviaire produit parfois un enduit écailleux et sec (Nocard, Grancher, Fischel).

Bouillon glycériné. — Le bouillon glycériné ou mieux glucosé glycériné est un milieu très favorable à la culture du bacille tuberculeux. On pratiquera les ensemencements avec les précautions suivantes : prélever avec l'öse des parcelles de cultures développées sur un milieu solide, et, de préférence, au niveau de la goutte de liquide qui se trouve au fond des tubes de gélose glycérinée; déposer ces fragments avec précaution de manière à les faire flotter à la surface du bouillon contenu dans de petits matras.

La culture se produit d'ordinaire en voile: dès le quinzième jour une auréole blanchâtre apparaît autour des fragments ensemencés; cette auréole s'étend et forme un voile mince qui recouvre toute la surface du bouillon ; ce voile, d'abord sec et fragile, s'épaissit ; tantôt il reste sec, écailleux, tantôt il devient gras, plissé, humide. Le voile grimpe fréquemment le long des parois du matras, sur une hauteur qui peut atteindre un centimètre. Rarement, le voile ne se forme pas et la culture se fait sous forme d'un sédiment floconneux. Dans tous les cas le bouillon reste clair.

Bouillon de poisson glycériné. — Ce milieu, recommandé par Martin pour la culture du bacille de Koch, se prépare de la façon suivante :

Hacher de la chair de hareng, y ajouter une fois et demie son poids d'eau, chauffer lentement et maintenir l'ébullition pendant trois-quarts d'heure. Filtrer à chaud plusieurs fois sur papier Chardin; le bouillon obtenu doit être clair, y ajouter 6 p. 100 de glycérine et s'assurer qu'il est neutre. Répartir et stériliser à l'autoclave.

Les caractères de la culture sont les mêmes que sur le bouillon ordinaire glycériné.

Pomme de terre. — Le bacille de la tuberculose pousse sur pomme de terre; pour obtenir de belles cultures il faut glycériner les pommes de terre suivant le procédé de Nocard :

La pomme de terre étant découpée en fragments, placer ceux-ci dans un cristallisoir et les couvrir d'eau additionnée de 15 p. 100 de glycérine; laisser en contact deux jours à la glacière, puis placer les fragments dans des tubes de Roux et stériliser comme d'ordinaire.

Sur ce milieu, la culture apparaît vers le douzième jour; elle forme d'ordinaire un voile épais, plissé, mou et rarement sec et rugueux. Souvent la culture gagne le liquide qui s'est égoutté dans la partie inférieure du tube et y forme un voile: ce voile est excellent pour pratiquer les ensemencements en milieux liquides.

RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX DANS L'ORGANISME.

La recherche de bacille tuberculeux varie, quant aux détails, avec les différents tissus ou exsudats, mais dans tous les cas on dispose de deux méthodes d'investigation.

I. — EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Les humeurs, tissus, etc., sont soumis à la coloration par les procédés de Ziehl ou d'Ehrlich: les bacilles tuberculeux seuls restent colorés; en réalité deux autres microbes pourraient être confondus avec le bacille de Koch, ce sont le bacille de la lèpre et le bacille du smegma; pour le premier, nous apprendrons à le différencier au chapitre suivant; pour le bacille du smegma, l'erreur n'est guère à redouter, étant donné le siège spécial de cette bactérie; en outre le bacille smegma, qui résiste comme le bacille tuberculeux à l'action des acides minéraux, se décolore rapidement quand on le soumet à l'action de l'alcool (probablement parce que l'alcool dissout les matières grasses qui l'imprègnent); en employant le procédé de Ziehl-Nelsen tel que nous l'avons décrit, on est donc à l'abri de toute confusion.

On préparera les frottis selon les méthodes ordinaires: les tissus à couper seront de préférence durcis par l'alcool absolu, le sublimé acide, ou le Flemming (Voy. p. 205)

II. — INOCULATIONS.

L'inoculation tranchera en dernier ressort dans les cas fréquents où l'examen microscopique sera demeuré négatif. On s'adressera toujours au cobaye, animal le plus réceptif. Quand on aura affaire à un produit pur, tel que : tubercule recueilli aseptiquement, pus, sérosité pleurale ou ascitique, l'inoculation pourra être pratiquée dans le péritoine ; mais, en règle, quand le produit a été exposé à une cause de souillure, quand il s'agit de crachats, de pus s'écoulant par une fistule, etc., l'inoculation devra être faite sous la peau, l'inoculation intra-péritonéale entraînant dans ces cas la production d'une péritonite banale qui emporte l'animal avant le développement de l'infection tuberculeuse.

Différents cas où l'on recherche le bacille tuberculeux.

A. **Crachats**. — **1° Examen microscopique**. — La recherche des bacilles tuberculeux dans les crachats est aisée quand ceux-ci sont nettement purulents et que les bacilles y fourmillent ; elle est beaucoup plus délicate et reste souvent infructueuse quand les crachats sont rares, muqueux et proviennent des lésions de début du processus tuberculeux, ou encore quand on a affaire à des crachats presque uniquement constitués par du sang, comme cela se produit dans les hémoptysies. En règle on recherchera toujours le bacille tuberculeux dans les crachats expectorés le matin.

Pour les crachats nummulaires, il suffira de prélever avec l'öse un petit fragment au centre de la masse purulente et de l'étaler sur une lamelle par le procédé ordinaire (p. 208). On cherchera de préférence dans les crachats les grumeaux jaunâtres qui sont très riches en bacilles ; de même pour les crachats muqueux on prélèvera autant que possible les portions solides nageant dans le liquide.

Le bacille de la tuberculose est très difficile à déceler dans le sang des hémoptysies ; on le rencontre plus aisément dans les crachats concrets, striés de sang, que les malades expectorent dans les jours qui suivent l'hémorragie.

Il est très rare de rencontrer des bacilles dans les crachats des malades atteints de granulie, les bacilles ne passant dans les crachats qu'au moment de la fonte purulente des lésions tuberculeuses.

Homogénisation. — Quand les crachats contiennent peu de bacilles, on a recours à un artifice pour mettre ceux-ci en évidence : on liquéfie et rend homogènes les crachats, puis on les abandonne au

repos ou on les soumet à la *centrifugation* ; le dépôt obtenu contient sous un petit volume tous les bacilles qui étaient disséminés dans la masse visqueuse, il est dès lors facile de retrouver et de colorer ces bacilles.

Procédé de Biedert. — A 15 ou 20 centimètres cubes de crachats on ajoute 30 à 40 centimètres cubes d'eau, puis quelques gouttes (5 à 15) de lessive de soude : ajouter d'autant plus de lessive de soude que les crachats sont plus épais, plus visqueux. On fait bouillir le mélange dans une capsule de porcelaine jusqu'à ce qu'il soit devenu bien homogène, puis on y ajoute un ou deux volumes d'eau et on porte de nouveau à ébullition pendant quelques instants. On abandonne alors le tout au repos dans un verre conique, pendant quarante-huit heures, puis on décante et on prépare des lamelles avec le dépôt.

Procédé d'Ilkewitch. — Mélanger un demi-centimètre cube de crachats, 20 centimètres cubes d'eau distillée et environ X gouttes de solution de potasse caustique à 1/30 ; chauffer dans une capsule de porcelaine sans atteindre l'ébullition et en remuant constamment jusqu'à ce que le mélange soit homogène ; ajouter alors un peu de caséine et une goutte ou deux de solution de potasse à 1/30 et continuer à chauffer jusqu'à ce que le liquide ait pris l'apparence du lait ; verser dans un verre à expérience, ajouter quelques gouttes d'acide acétique jusqu'à commencement de coagulation ; centrifuger pendant quelques minutes et préparer des lamelles avec le dépôt.

Procédé de Sprengler. — Mélanger 10 centimètres cubes de crachats, 20 centimètres cubes d'eau tiède et une goutte de solution normale de soude, ajouter $0^{gr},25$ à $0^{gr},50$ de pancréatine et placer le tout à l'étuve à $+ 37^{c}$; au bout de deux à trois heures verser dans un verre conique, ajouter un cristal de thymol pour empêcher la putréfaction et laisser déposer pendant douze à quatorze heures ; décanter alors et préparer des lamelles avec le sédiment.

Les lamelles préparées avec les crachats ou les dépôts de crachats homogénisés sont colorées par un des procédés que nous avons indiqués ; le procédé de Ziehl-Nelsen est le plus recommandable.

2° **Inoculations.** — Quand, après un examen microscopique négatif, il reste des doutes sur la nature des crachats, on doit pratiquer l'inoculation. Un crachat recueilli purement (Voy. p. 189) est broyé avec un peu d'eau stérile et l'émulsion obtenue est injectée sous la peau d'un cobaye ; si le crachat est tuberculeux, l'animal ne tardera pas à présenter les symptômes de la tuberculose (Voy. p. 420) ; les crachats ne doivent jamais être injectés dans le péritoine, car ils détermineraient le plus fréquemment une péritonite aiguë banale.

3° **Cultures**. — L'ensemencement des crachats ne peut être d'aucune utilité au point de vue du diagnostic de la tuberculose. Longtemps on a considéré comme impossible d'obtenir des cultures de bacille de Koch en partant des crachats, mais Kitasato et Pastor ont décrit des procédés permettant d'obtenir des ensemencements fertiles.

Procédé de Kitasato. — Faire laver la bouche du malade à l'eau stérile, provoquer la toux et recevoir le crachat dans un verre flambé ; laver le crachat dans une dizaine de verres contenant de l'eau stérile (Voy. p. 189), puis prélever purement un petit fragment au centre de la masse purulente et l'étendre sur du sérum glycériné ensemencer un grand nombre de tubes. La culture se développe au bout de dix à douze jours à + 38°.

Procédé de Pastor. — Faire laver la bouche du malade à l'eau stérile provoquer la toux et recevoir le crachat dans un verre stérile émulsionner le crachat dans un peu d'eau stérile, puis filtrer l'émulsion sur un morceau de gaze préalablement bouilli. Ensemencer un tube de gélatine liquéfiée avec quelques gouttes de liquide obtenu couler le tout dans une boîte de Petri et laisser solidifier. Au bout de trois à quatre jours d'exposition à + 20°, les microbes d'impureté se sont développés et forment de nombreuses colonies; entre ces colonies on détache, avec un scalpel flambé, des portions de gélatine restées stériles et on les transporte sur des tubes de sérum glycériné ; en ensemençant ainsi de nombreux tubes on obtient sur quelques-uns une culture pure de bacille de Koch.

B. **Sang**. — Le bacille de la tuberculose passe parfois dans le sang des malades atteints de granulie, mais il est très difficile de le déceler dans ce liquide. Lustig, Benda, Rutimeyer, Sticker ont réussi cependant à le colorer dans des lamelles préparées avec le sang obtenu par piqûre du doigt ou de la rate ; il est plus aisé de le mettre en évidence dans les caillots formés après la mort dans le cœur ou les vaisseaux. On emploiera pour cette recherche le procédé de coloration de Ziehl-Nelsen.

C. **Pus**. — Le pus tuberculeux contient des bacilles en très petit nombre, aussi la recherche dans les lamelles colorées est-elle le plus souvent infructueuse. On utilisera avec avantage pour cette recherche un des procédé d'homogénisation que nous avons indiqués à propos des crachats, encore échouera-t-on le plus souvent. Il sera toujours préférable de pratiquer une inoculation au cobaye. Le bacille de Koch existe le plus souvent à l'état pur dans le pus tuberculeux, mais il peut s'y trouver associé aux microbes ordinaires de la suppuration et particulièrement aux staphylocoques.

D. **Sérosités.** — Dans les liquides séro-fibrineux de la pleurésie, de la péritonite, de la péricardite, etc., il faut renoncer à rechercher le bacille de Koch par l'examen microscopique : l'insuccès de ce mode d'investigation est constant.

Le procédé classique de recherche consiste à inoculer au cobaye le liquide suspect ; encore faut-il savoir que l'inoculation de la sérosité de pleurésies tuberculeuses reste sans succès dans les trois quarts des cas (Kelch et Vaillard, Netter).

L'inoculation se fera de préférence dans le péritoine, on injectera une grande quantité (10 à 15 centimètres cubes) du liquide recueilli purement.

Procédé de Debove et Renault. — Debove et Renault ont imaginé un procédé fort ingénieux pour reconnaître la nature tuberculeuse d'un épanchement ; ils ont montré que les sérosités pleurétiques, péricardiques, etc., de nature tuberculeuse contiennent de la tuberculine : en inoculant un peu de ces sérosités à un cobaye tuberculeux on obtient la réaction caractéristique de la tuberculine (Voy. p. 443).

E. **Fongosités.** — L'examen microscopique échoue le plus souvent à y déceler la présence du bacille de Koch : on aura recours à l'inoculation d'une parcelle de la fongosité sous la peau d'un cobaye.

F. **Cavités nasales.** — Straus a montré que le bacille tuberculeux se rencontre fréquemment (1 fois sur 3) dans les fosses nasales des individus sains vivant dans un milieu où se trouvent des phtisiques. Straus a utilisé pour ses recherches la technique suivante :

Préparer de petits écouvillons constitués par de minces baguettes de bois longues de 10 à 15 centimètres et à une des extrémités desquelles on enroule un peu d'ouate hydrophile ; ces écouvillons, disposés dans un tube bouché à l'ouate, sont stérilisés au four de Pasteur. Pour opérer le prélèvement, on fait pénétrer un de ces écouvillons dans la cavité nasale et on l'y promène en frottant légèrement de manière à recueillir les poussières et mucosités qui tapissent les parois. On porte ensuite le tampon de l'écouvillon dans un peu d'eau stérile et on l'y lave avec soin ; on recommence six à huit fois la même manœuvre pour un seul nez et les différents tampons sont lavés dans la même eau ; on injecte cette eau dans le péritoine d'un cobaye.

G. **Urines.** — La recherche microscopique des bacilles de Koch dans l'urine des malades atteints de tuberculose des voies urinaires donne le plus souvent des résultats négatifs ; c'est à peine si on rencontre le bacille dans un quart des cas en examinant le dépôt obtenu par centrifugation.

Quand l'urine est claire, on la verse dans un grand verre à expé-

rience et on y ajoute un fragment de thymol ou de camphre ; au bout de vingt-quatre heures on décante et on prépare des lamelles avec le sédiment; on utilisera de préférence les grumeaux purulents qui se rencontrent dans certains dépôts ; quand il se forme un dépôt purulent abondant, on le traite par un des procédés d'homogénisation et on centrifuge le liquide obtenu. Si, après vingt-quatre heures de dépôt, l'urine n'abandonne qu'un dépôt minime, on décante la partie supérieure du liquide, on ajoute aux quelques centimètres cubes qui restent au fond du verre leur volume d'alcool à 95[c] et on soumet à la centrifugation.

Quand l'urine peut être recueillie purement (Voy. p. 33) et qu'elle n'est souillée ni par le bacterium coli ni par les microbes pyogènes, on peut en injecter quelques centimètres cubes dans le péritoine d'un cobaye ; c'est là un excellent mode de recherche.

H. **Lait.** — Les bacilles tuberculeux ne se trouvent qu'en petit nombre dans le lait, aussi a-t-on peu de chances de les déceler par l'examen microscopique; plusieurs procédés ont été préconisés :

a) Laisser déposer le lait frais pendant vingt-quatre heures et rechercher le bacille dans le sédiment.

b) Centrifuger et rechercher le bacille dans le dépôt obtenu.

c) Coaguler 20 centilitres de lait en y ajoutant un peu d'acide citrique en poudre; filtrer; dissoudre le précipité sur le filtre dans une solution de phosphate de soude ; placer le liquide obtenu dans un gros tube à essai, y verser quelques centimètres cubes d'éther, agiter pendant une dizaine de minutes; décanter l'éther chargé de beurre et soumettre le liquide aqueux à la centrifugation ; examiner le dépôt.

Mais l'inoculation intra-péritonéale au cobaye de quelques centimètres cubes de lait recueilli purement est le seul procédé sur lequel on puisse compter.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité, virulence. — Pour rechercher la vitalité d'un produit tuberculeux, il faut toujours pratiquer des inoculations avec ce produit et non l'ensemencer.

Dans les cultures le bacille tuberculeux est peu résistant aux agents de destruction : ce fait seul suffit pour permettre d'affirmer qu'il ne possède pas de spores. Une exposition de dix minutes à + 70[c] ou + 75[c] suffit pour stériliser les cultures en milieux liquides. Dans les crachats humides le bacille résiste à + 75[c], mais il est tué en cinq minutes à + 100[c].

Le bacille tuberculeux résiste mieux à la dessiccation : des cultures

ou des crachats desséchés à la température ordinaire peuvent garder leur virulence pendant plusieurs mois (Galtier) et résistent à l'action de températures élevées; le bacille dans ces conditions n'est pas détruit par une exposition de une à trois heures à une température sèche de + 100° et résiste plus de sept heures à + 70°. (Welch, Grancher, Ledoux-Lebard).

Candler, Koch, Migneco et Ransonne ont montré que l'action combinée de la dessiccation et de la lumière solaire atténue la virulence du bacille quand l'influence de la lumière se prolonge pendant plus de deux heures, mais ne parvient pas à faire disparaître sa vitalité, même après plusieurs jours.

Zilgen mélange des poussières avec des crachats tuberculeux desséchés et expose le tout au soleil : la virulence persiste dans ces conditions pendant environ cent quarante jours. D'après De Toma la virulence des crachats abandonnés dans une chambre de malades disparaîtrait après deux mois et demi et se conserverait indéfiniment quand les crachats sont en même temps placés à l'obscurité.

Malassez et Vignal ont vu que la virulence de crachats tuberculeux exposés à l'action alternante de l'humidité et de la dessiccation se conservait pendant plusieurs mois.

Les cultures de bacille de Koch sur gélose perdent leur virulence après quelques mois.

Dans l'eau le bacille tuberculeux paraît conserver longtemps sa vitalité; on le retrouve après immersion de soixante-dix jours dans l'eau stérile (Chantemesse et Widal) et de cent cinquante jours dans l'eau courante (Cadéac et Malet).

La putréfaction a peu d'action sur le bacille de Koch : des organes tuberculeux abandonnés pendant vingt et quarante jours à la putréfaction dans l'eau ordinaire ont conservé leur virulence (Galtier); des poumons tuberculeux enterrés pendant cent soixante-sept jours ont été retrouvés virulents (Cadéac et Malet). Schottelius a observé que le bacille de Koch conserve sa virulence après un séjour de deux ans dans la terre, Gærtner a fait la même constatation après un séjour d'un hiver.

Action des antiseptiques. — Dans les cultures le bacille tuberculeux est très sensible à l'action des antiseptiques; d'après Yersin les bacilles sont tués par un séjour de trente secondes dans l'acide phénique à 5 p. 100, de cinq minutes dans l'alcool absolu et dans l'éther iodoformé à 1 p. 100, de dix minutes dans le sublimé à 1 p. 1000, plusieurs heures dans le thymol à 3 p. 1000 et dans l'acide salicylique à 2,5 p. 1000; ils résistent plus de douze heures dans l'acide borique à 4 p. 100.

D'après Koch, les substances suivantes entravent aisément le développement des cultures : huiles essentielles, naphtol β, fuchsine, bleu de méthylène, violet de gentiane et surtout cyanures d'or et d'argent ; le cyanure d'or arrête la multiplication du bacille à la dose de 1/2 000 000e.

Mais, dans les sucs et organes tuberculeux, la résistance du bacille est beaucoup plus grande, l'acide salicylique à 1/500, le brome à 1 p. 1000, la créosote, la quinine, le sublimé à 1 p. 100 sont sans action. A 6 p. 100 l'acide phénique a un effet douteux, l'acide salicylique n'a pas d'action destructive à 1/4000, solution caustique (H. Martin). Les nombreuses expériences de Vallin, Mairet, Cavalier, Coze et Siamon, etc., ont donné des résultats contradictoires.

INFECTIONS ASSOCIÉES.

Le bacille de Koch se trouve fréquemment associé, dans les lésions tuberculeuses, à différents microbes, d'ordinaire pyogènes. Dans les cavernes pulmonaires on trouve une riche flore microbienne : à côté de bacilles tuberculeux se développent les staphylocoques pyogènes, le streptocoque, le pneumobacille, le pneumocoque, le bacille du pus bleu, le micrococcus tetragenus, les bactéries de la putréfaction, etc , etc. La fièvre hectique des tuberculeux est due à la résorption des toxines sécrétées par ces microbes. — Dans les ganglions tuberculeux, les lésions des méninges, etc., on trouve fréquemment le pneumocoque, le streptocoque, les staphylocoques, associés au bacille tuberculeux.

PRODUITS SOLUBLES.

I. — Hammerschlag épuise des bacilles tuberculeux desséchés par l'alcool-éther et obtient un extrait qui est toxique pour le lapin et le cobaye ; les animaux auxquels on injecte ce produit meurent après avoir présenté des phénomènes convulsifs.

Weyl a extrait des bacilles une substance qui, injectée sous la peau des cobayes, provoque une nécrose au point d'inoculation.

Zuelzer a isolé des cultures un alcaloïde qui tue les cobayes en trois à quatre jours avec une violente élévation de la température, de la dyspnée, des hémorragies muqueuses, etc.

Koch, Mafucci, Budden, Grancher, Straus et Gamaleia observent que les cultures sur gélose stérilisées par la chaleur restent nocives pour les animaux et peuvent, à doses suffisantes, entraîner des suppurations, la cachexie et la mort, chez le cobaye. Les bacilles

tués, injectés dans le sang ou le péritoine, provoquent la formation de véritables tubercules dans lesquels on retrouve des bacilles morts, mais ces tubercules ne se trouvent qu'aux points où les bacilles ont été apportés ; ils ne se généralisent pas et ne sont pas réinoculables.

II. **Tuberculine**. — La tuberculine a été préparée par Koch en 1890 au moyen des cultures en bouillon glycériné.

La tuberculine n'a pas une composition définie, c'est un simple extrait des cultures stérilisées en bouillon glycériné, extrait qui contient, à côté des substances sécrétées par le bacille, celles qui préexistaient dans le bouillon. On n'a pu encore extraire le principe actif de la tuberculine.

La tuberculine est préparée ainsi qu'il suit à l'Institut Pasteur :

On fait une culture du bacille de la tuberculose aviaire en bouillon glycériné dans un matras (le bacille humain et le bacille aviaire sécrètent également de la tuberculine, mais le bacille aviaire se développant plus rapidement, il y a avantage à l'utiliser). Il est indispensable que la culture se développe en voile ; le voile apparaît du quinzième au vingtième jour à + 37°; la culture est complète au trente-deuxième ou trente-cinquième jour.

La culture totale est stérilisée à + 100° puis on la concentre au 1/10 au bain-marie ; le liquide obtenu, filtré sur papier, constitue la *tuberculine brute*. Cette tuberculine est un liquide brunâtre, sirupeux, répand une légère odeur suave caractéristique.

On a cherché à purifier cette tuberculine brute :

a). En l'additionnant de 20 volumes d'alcool fort, on obtient un précipité brun contenant la substance active mélangée à de nombreuses matières étrangères ; le tannin, l'acide picrique, les sels métalliques, le ferrocyanure de potassium et l'acide acétique déterminent également la formation d'un précipité albuminoïde qui contient la substance active ; les recherches de Koch, de Hunter et de Klebs dans le but de purifier ce précipité ont échoué.

b). En précipitant la tuberculine brute par 3 volumes d'alcool à 66°, Koch obtient un précipité floconneux, qui, après dessiccation, abandonne une poudre blanche, c'est la *tuberculine purifiée*, contenant de nombreux principes étrangers, mais qui est très active : elle tue le cobaye à la dose de 1 milligramme. Cette méthode de préparation est très dispendieuse, les 9/10 de la tuberculine restent dissous et se trouvent perdus.

Il n'y a aucun avantage à utiliser la tuberculine purifiée, elle a exactement les mêmes propriétés que la tuberculine brute.

Action de la tuberculine sur les animaux. — La tuberculine brute injectée à petites doses à des animaux sains ne produit aucun accident ou élève très légèrement la température ; un cobaye supporte sans troubles une injection de 2 centimètres de tuberculine ; le lapin

supporte très bien l'injection de 5 centimètres de tuberculine brute, il présente un peu de fièvre et un amaigrissement passager, mais il guérit vite ; les bovidés, le chien ne réagissent pas à des doses de 10 centimètres cubes. L'homme est beaucoup plus sensible que le cobaye, une injection de 0ccm,25 provoque chez l'homme sain une indisposition assez grâve : la température s'élève jusqu'à 39c, il survient des frissons, de la diarrhée, des vomissements (Koch) ; la dose de 0ccm,01 peut déjà produire une légère élévation de la température ; l'homme est 1000 à 1500 fois plus sensible que le cobaye à la tuberculine.

Chez les animaux et l'homme tuberculeux, l'inoculation de faibles doses de tuberculine provoque des réactions intenses et des troubles graves pouvant aboutir rapidement à la mort.

Un demi-centimètre cube de tuberculine bien préparée tue rapidement un cobaye tuberculisé depuis cinq à six semaines : il se produit une élévation brusque de température suivie d'un abaissement progressif, l'animal présente du coma et meurt. A l'autopsie, on trouve une congestion intense autour des points tuberculeux, les organes sont rouges, congestionnés et présentent des taches ecchymotiques.

Chez les bovidés tuberculeux des doses de 0,30 à 0,40 centimètres cubes amènent dès la sixième heure une élévation de la température centrale qui passe de 36c à 39c et 40c, puis, au bout de quelques jours, tout revient à la normale ; des doses plus fortes de tuberculine pourraient entraîner la mort de l'animal.

L'homme tuberculeux réagit avec une intensité formidable à l'inoculation de la tuberculine, un quart de centimètre cube le tuerait infailliblement. Les doses soi-disant curatives de Koch étaient de 0,003 à 0,004 centimètres cubes ; après l'inoculation il survenait des frissons, la température s'élevait jusqu'à 41c, souvent il se produisait de la toux, des nausées, des vomissements, de l'ictère, etc. ; au niveau des tuberculoses cutanées on voyait se produire une réaction inflammatoire intense. D'après Koch, ces symptômes devaient durer douze à quinze heures, puis faire place à une amélioration progressive des lésions préexistantes ; il est inutile de rappeler les désastres que la tuberculine a à son actif.

Diagnostic de la tuberculose par la tuberculine. — Nocard a montré que la tuberculine est un réactif précieux de la tuberculose des bovidés. Chez ces animaux le diagnostic précoce de la tuberculose est le plus souvent impossible par les moyens de la clinique ; or il est très important au point de vue de la prophylaxie de reconnaître dès le début les animaux atteints.

Les bovidés tuberculeux, si minimes que soient leurs lésions,

réagissent à l'inoculation d'une dose de 0^{gr},30 à 0^{gr},40 de tuberculine brute; leur température s'élève de 1^{c},5 à 3^{c}.

Les animaux non tuberculeux ne réagissent pas dans les mêmes conditions.

On opère de la façon suivante :

1° Préparer une solution de tuberculine :

Tuberculine diluée.

Tuberculine brute.......................... ..	1 centimètre cube.
Eau bouillie et phéniquée à 5 p. 1000..........	9 centimètres cubes.

Cette solution s'altère assez rapidement; elle doit toujours être employée, fraîche.

2° L'animal à éprouver est mis au repos, on lui prend la température rectale la veille et le jour de l'opération.

3° On injecte sous la peau de l'encolure, suivant la taille de l'animal, 3 à 4 centimètres cubes de tuberculine diluée, en prenant toutes les précautions d'asepsie ordinaires.

4° A partir de la douzième heure après l'injection, et de la douzième à la vingt-quatrième heure, on prend trois fois la température de l'animal. Tout animal qui présente une élévation de température atteignant 1^{c},4 doit être considéré comme tuberculeux. Un animal qui présente une élévation minime de 0^{c},5 à 0^{c},8 est sain. Quand l'élévation de la température est comprise entre 0^{c},8 et 1^{c},4, l'animal est simplement suspect et doit être soumis à une nouvelle épreuve après un intervalle d'un mois.

Chez l'homme on a utilisé la tuberculine pour reconnaître la tuberculose dans les cas douteux (Grasset, etc.). Cette épreuve ne doit être pratiquée qu'avec une extrême prudence et s'applique de préférence aux tuberculoses chirurgicales. En aucun cas la dose de tuberculine injectée ne devra dépasser 0^{gr},002. On utilisera la solution suivante.

Tuberculine brute..........................	10 centimètres cubes.
Eau bouillie phéniquée à 5 p. 1000...........	100 —

Un centimètre cube contient 0^{gr},004 de tuberculine brute. Après avoir pris soigneusement la température pendant deux à trois jours on injecte un demi-centimètre cube de la solution : on prend la température toutes les huit heures pendant trente-six heures et on observe avec soin l'organe supposé atteint par le bacille, la réaction locale présentant la plus grande importance au point de vue du diagnostic.

VACCINATION.

I. Grancher et Martin atténuent des cultures de tuberculose aviaire par le vieillissement, puis les inoculent au lapin ; en donnant successivement des cultures de moins en moins vieilles, ils arrivent dans quelques cas à conférer une certaine immunité à l'animal.

II. Héricourt et Richet stérilisent des cultures de tuberculose aviaire par plusieurs chauffages successifs à + 80°, puis les injectent au lapin à la dose de 10 à 20 centimètres cubes ; ce procédé leur a permis de conférer l'immunité à quelques animaux.

III. Courmont et Dor filtrent des cultures en bouillon glycériné et injectent le filtrat à des lapins en même temps ou avant l'inoculation de virus tuberculeux ; avec le bacille aviaire ils ont réussi à conférer l'immunité deux fois sur quatre expériences, mais ils ont échoué avec le bacille humain.

En résumé, on est arrivé dans quelques cas à vacciner le lapin contre la tuberculose aviaire, mais on a toujours échoué dans les essais dirigés contre la tuberculose humaine. Le cobaye n'a jamais pu être immunisé.

Koch pensa à immuniser et même à guérir les animaux et l'homme avec sa tuberculine ; de ses recherches et de celles de ses élèves (Pfuhl, Kitasato, etc.), il ne reste rien aujourd'hui.

SÉROTHÉRAPIE.

La sérothérapie de la tuberculose n'a donné encore aucun résultat positif : jusqu'à présent on n'est pas parvenu à vacciner les animaux contre la tuberculose, à plus forte raison n'a-t-on pu obtenir un sérum antituberculeux.

Richet et Héricourt injectant à des lapins du sérum de chien avant l'inoculation du bacille de Koch ont pu retarder chez ces animaux la marche de l'infection ; malheureusement les succès ne furent toujours que très relatifs et inconstants.

Il en fut des résultats obtenus par Bertin et Picq par l'injection de sérum de chèvre.

Behring et Niemann n'eurent pas plus de succès avec le sang d'animaux traités par la tuberculine.

Bernheim a essayé sans succès le sang provenant d'animaux inoculés avec des cultures de tuberculose filtrées et non chauffées ; les résultats obtenus par Babès et Broca ne furent pas plus concluants.

Maragliano enfin a obtenu un sérum doué de propriétés antitoxiques évidentes. Il injecte à des animaux, à doses croissantes, un mélange

de 3 parties de tuberculine et d'une partie d'un extrait concentré dans le vide de cultures filtrées sur porcelaine et non chauffées. Le sérum fournit par ces animaux détruit *in vitro* les propriétés toxiques de la tuberculine ; mais les résultats obtenus dans l'infection tuberculeuse ne sont pas encore concluants.

PSEUDO-TUBERCULOSES.

A côté du bacille de Koch il existe un certain nombre d'autres microorganismes pathogènes capables de déterminer dans les tissus la formation de tubercules.

Le bacille de la lèpre, celui de la morve (voir plus loin), donnent lieu à la formation de véritables tubercules. A propos des *streptothricées* nous verrons qu'un certain nombre de ces microorganismes donnent lieu chez l'homme et les animaux à des pseudo-tuberculoses.

Enfin certaines bactéries peuvent donner lieu à des lésions simulant à s'y méprendre celles que cause le bacille de Koch : on peut ramener ces pseudo-tuberculoses à deux types : la *pseudo-tuberculose zooglééique* de Malassez et Vignal, Chantemesse, etc. ; la *pseudo-tuberculose bacillaire* de Charrin et Roger, Dor, Courmont, Du Cazal et Vaillard, Legrain, etc.

Les descriptions des différents auteurs concordent mal, peut-être se rapportent-elles à un certain nombre de variétés voisines d'un même microorganisme. Il nous suffira d'avoir signalé l'existence de ces microbes ; il n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage de nous attarder à leur description.

CHAPITRE XX

LE BACILLE DE LA LÈPRE

Le bacille de la lèpre, découvert par Armauer Hansen, se retrouve dans les trois formes de la maladie : lèpre tuberculeuse, lèpre anesthésique, lèpre mixte.

La lèpre est une maladie propre à l'homme; les animaux ne présentent jamais la lèpre spontanée et les essais d'inoculation ont échoué; la lèpre est une affection contagieuse.

Chez l'homme, Arning aurait réussi à inoculer la lèpre au condamné Keanz, mais, dans ce cas, l'hypothèse d'une contagion naturelle peut être invoquée; il en est de même de deux ou trois autres observations où l'inoculation de la lèpre aurait été pratiquée avec succès. D'autre part, de très nombreux essais d'inoculation à l'homme ont donné des résultats négatifs entre les mains de divers expérimentateurs.

Chez l'animal, l'inoculation du tissu lépreux a toujours échoué. Les lésions qu'ont obtenues Melcher et Orthmann, Tedeschi, en inoculant au lapin des fragments de tissus lépreux relevaient de microbes étrangers à la lèpre et probablement du bacille de la tuberculose. De nombreuses inoculations pratiquées sur le singe (Babès), le porc (Hilairet et Gaucher. Vidal), le chien (Neisser, Otto Danisch), le lapin (Wesener), les vertébrés à sang froid (Kobner) et plus récemment des tentatives de Besnier et Leloir ont toujours échoué à reproduire la lèpre. D'après Wesener, l'impossibilité d'inoculer la lèpre tiendrait à ce que dans les tubercules lépreux, la plupart sinon la totalité des bacilles sont morts.

Quand on inocule sous la peau d'un animal un fragment de tissu lépreux, ce tissu conserve longtemps son aspect et, pendant plusieurs mois encore, on peut colorer les bacilles qu'il contient, mais on n'observe jamais de multiplication de ces bacilles; des leucocytes s'accumulent autour du corps étranger et celui-ci est résorbé peu à peu.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Le bacille de la lèpre a l'aspect de fins bâtonnets à bouts arrondis, de mêmes dimensions que le bacille tuberculeux (5 à $6\ \mu \times 0.5\ \mu$).

Ces bacilles sont droits ou très légèrement incurvés ; d'ordinaire, ils sont plus rectilignes que ceux de la tuberculose ; leurs extrémités sont parfois légèrement renflées.

Coloration. — Le bacille de la lèpre, comme le bacille de la tuberculose, se colore par les méthodes d'Ehrlich et de Ziehl, mais il fixe plus énergiquement que ce dernier les solutions hydroalcooliques de couleurs d'aniline. Il prend le Gram ; après coloration par les solutions d'Ehrlich ou de Ziehl, il résiste beaucoup mieux que le bacille de la tuberculose à l'action des agents décolorants. Il est donc aisé de différencier ces deux bacilles, nous donnons sous forme de tableau les termes principaux de ce diagnostic :

Bacille de la lèpre.	*Bacille de la tuberculose.*
Colorable par les solutions aqueuses de couleur d'aniline.	Non colorable par les solutions aqueuses non mordancées.
Se colore par la méthode de Gram.	Ne se colore pas par la méthode de Gram simple.
Prend le Ziehl et l'Ehrlich et résiste longtemps aux solutions acides.	Prend le Ziehl et l'Ehrlich, mais résiste beaucoup moins que le bacille de la lèpre aux agents décolorants.
Se colore par la méthode de Baumgarten.	Ne se colore pas par la méthode de Baumgarten.
Bacilles en très grand nombre à l'intérieur des cellules des nodules lépreux.	Les cellules tuberculeuses contiennent un nombre restreint de bacilles.

Procédé de coloration de Baumgarten. — Colorer pendant 5 minutes à froid dans le violet aniliné, puis décolorer avec la solution suivante :

Alcool absolu	10 centimètres cubes.
Acide nitrique	1 centimètre cube.

Laver à l'eau, distiller, sécher, monter.

Le bacille de la lèpre reste coloré en violet ; le bacille de la tuberculose se décolore.

Après coloration, le bacille de la lèpre est fréquemment granuleux ; son protoplasma contient des vacuoles irrégulières ; aux extrémités apparaissent souvent des renflements facilement colorables et que certains auteurs considèrent comme des spores.

RÉPARTITION DES BACILLES DANS LES LÉSIONS LÉPREUSES.

Le bacille de la lèpre est très abondant dans les lésions lépreuses. On le rencontre principalement dans les nodules du tissu conjonctif, il est plus rare dans les os et les cellules nerveuses (Sudakewitch).

Les tubercules lépreux sont constitués par de grandes cellules analogues

aux cellules épithélioïdes, ne possédant d'ordinaire qu'un seul noyau et bondées de bacilles : ce sont les *cellules lépreuses*; certaines de ces cellules présentent des vacuoles.

Le bacille lépreux a donc un siège intracellulaire. Les cellules s'incorporent le bacille, grâce à leurs mouvements amœboïdes; les cellules nerveuses dans lesquelles on rencontre des bacilles englobent de même ceux-ci à la faveur des mouvements amœboïdes de leurs prolongements protoplasmiques.



Fig. 174. — Bacille de la lèpre (coupe de rate lépreuse). Méthode de Ziehl Nelsen (double coloration). Reich., Ob. 1/12 im.; Oc. II.

Jamais on ne rencontre le bacille dans les leucocytes polynucléaires. Le bacille de la lèpre semble conserver indéfiniment ses caractères dans les tissus où il s'est développé; cependant, dans certains cas, on observe de la dégénérescence jaune.

INFECTIONS SECONDAIRES.

Le bacille de la lèpre déterminant des érosions de la peau et des muqueuses, des lésions du poumon, facilite la pénétration dans l'organisme d'un grand nombre de microbes qui viennent créer des infections secondaires.

Les lésions de la peau et des muqueuses sont rapidement envahies par les microbes de la suppuration (staphylocoques, bacille pyocyanique, etc.), dans de la sanie lépreuse, chez un lépreux de Tunis, nous avons pu reconnaître et isoler, à côté d'un petit nombre de bacilles lépreux, le staphylocoque doré, le bacille pyocyanique et le *bacterium coli*. Les microbes de la suppuration peuvent envahir l'organisme lépreux et déterminer une pyohémie rapidement mortelle (Babès).

Babès a noté fréquemment l'existence des bacilles de Koch chez les lépreux; c'est là une association fréquente, particulièrement dans le poumon; dans les lésions pulmonaires encore peut se rencontrer le pneumocoque.

Dans trois cas de lèpre, Babès a rencontré dans la moelle osseuse, la rate et les reins, un bacille facilement cultivable, ne se colorant pas par les procédés d'Ehrlich et de Ziehl, et provenant d'une infection secondaire.

CULTURES.

Le bacille de la lèpre n'a pu encore être cultivé (Roux, Cornil et Chantemesse, etc.).

Les nombreuses infections secondaires que l'on rencontre chez les lépreux ont permis à plusieurs expérimentateurs d'obtenir des cultures avec

les produits lépreux, mais ces cultures ne relèvent aucunement du bacille d'Armauer Hansen. C'est ainsi, par exemple, que Bordoni Uffreduzzi a décrit comme cultures du bacille de la lèpre des cultures qui se rapportent évidemment au bacille tuberculeux ; pas davantage les cultures de Neisser ne relèvent du bacille lépreux ; les cultures de Babès étaient constituées, comme nous l'avons dit, par un bacille ne se colorant ni par l'Ehrlich ni par le Ziehl. Il ne semble pas que l'on doive accepter davantage les résultats de Ducrey, qui a obtenu des cultures d'un microbe anaérobie indéterminé.

RECHERCHE DU BACILLE DE LA LÈPRE.

La recherche du bacille de la lèpre est basée uniquement sur l'examen microscopique. Elle portera sur les frottis et les coupes préparés avec des tumeurs et des tissus lépreux.

Le microbe de la lèpre se trouve dans les tubercules lépreux, dans la moelle osseuse, dans la rate ; la figure que nous donnons ci-contre reproduit une de nos préparations de rate lépreuse, les bacilles y sont nombreux. On trouve également le bacille dans les ganglions, la sanie lépreuse, la salive quand la muqueuse buccale est envahie, les fèces quand il existe de la lèpre du gros intestin, le sperme quand le testicule est envahi, le lait (Babès), etc.

Dans le sang, Arning n'a jamais rencontré le bacille lépreux ; d'après Cornil et Babès, le bacille passerait dans le sang de la circulation générale quelques jours avant la mort et particulièrement pendant les accès de fièvre.

La technique à employer pour la recherche du bacille est la suivante :

a) Les frottis sont colorés par la méthode de Ziehl ; on y différencierait le bacille de la lèpre de celui de la tuberculose en faisant trois épreuves :

1° Simple coloration par une solution hydroalcoolique de fuchsine ;

2° Coloration par le procédé de Gram ;

3° Coloration par le procédé de Baumgarten.

b) Les coupes préparées avec des fragments de tissus durcis à l'alcool et inclus à la paraffine sont colorées par le Ziehl ; au besoin on les soumettrait aux procédés de diagnose exposés à propos des frottis.

CHAPITRE XXI

LE BACILLE DE LA MORVE

Le bacille de la morve a été découvert simultanément par Löffler et Schütz et par Bouchard, Capitan et Charrin.

Suivant que les localisations du bacille de Löffler et Schütz prédominent sur les organes internes ou sur la peau, on distingue cliniquement la morve et le farcin. La morve, plus fréquente que le farcin, est caractérisée par l'envahissement de la muqueuse nasale (chancres de la pituitaire, jetage), puis des viscères, en particulier du poumon et des organes génitaux ; la morve peut être aiguë ou chronique. Le farcin, aigu ou chronique, a pour principales lésions des abcès cutanés ou boutons farcineux qui aboutissent à des chancres, des lymphangites et quelquefois le sarcocèle morveux. On n'observe jamais le passage des formes aiguës aux formes chroniques. Il ne faut pas confondre avec cette maladie le farcin du bœuf, affection très différente, non transmissible à l'homme et due à un streptothrix.

MORVE SPONTANÉE.

La morve spontanée s'observe presque toujours chez les solipèdes; l'homme est rarement atteint ; il prend la morve du cheval ; quelquefois l'homme a contracté la morve en maniant des cultures du bacille de Löffler-Schütz : ces cultures sont très virulentes et très dangereuses à manier (cas de Kalning, Protopopoff, etc.).

On a observé également la morve spontanée chez des carnassiers, lions et tigres qui avaient été nourris avec des viandes morveuses.

MORVE EXPÉRIMENTALE.

Ane. — L'âne est de tous les animaux le plus sensible à la morve: après l'inoculation, il prend presque toujours la morve aiguë : Arloing a observé une fois la morve chronique chez l'âne après inoculation.

On inocule d'ordinaire l'âne en pratiquant quelques scarifications

sur la peau du front et en frottant la surface scarifiée avec la matière morveuse (pus, jetage, etc.).

Très rapidement, il se produit de l'œdème, puis une ulcération au niveau des stries d'inoculation; la température s'élève, atteint 40 et 41° ; les ganglions voisins s'engorgent, le jetage apparaît et l'animal succombe en quelques jours.

A l'autopsie : boutons morveux n'ayant pas, le plus souvent, eu le temps de s'ulcérer, sur les muqueuses nasale et laryngo-trachiale; le poumon est farci de petits infarctus, dont la pression fait sourdre de petites gouttelettes de pus épais, blanchâtre, très virulent. Ces lésions peuvent se retrouver sur le foie, les reins, la rate, etc.

Mulet, cheval. — Le mulet est plus réceptif que le cheval. Chez ces animaux l'inoculation cutanée donne lieu d'ordinaire à une morve subaiguë ou chronique. La température s'élève peu ou reste normale, le jetage s'établit, les ganglions de l'auge se tuméfient, on note quelquefois des râles, de l'essoufflement, mais les symptômes peuvent rester peu accusés pendant longtemps. A l'autopsie, on trouve des chancres de la pituitaire et, dans le poumon, des tubercules morveux apparaissant sous forme de petits points grisâtres avec un liséré de congestion ; le point grisâtre est constitué par une coque fibreuse contenant une gouttelette de pus.

Cobaye. — Le cobaye est très sensible à la morve ; il doit être placé après l'âne dans l'échelle de réceptivité.

Si l'on se trouve en présence d'un virus morveux pur, il est préférable d'inoculer le cobaye dans le péritoine : l'affection se développe avec une marche très caractéristique.

En présence d'un produit impur, l'inoculation dans le péritoine exposerait au développement d'une péritonite banale. Mieux vaut alors inoculer un premier cobaye sous la peau ; il ne tarde pas à se former un abcès morveux au point d'inoculation ; les ganglions voisins se tuméfient. On prélève un de ces ganglions et on en broye une partie avec un peu d'eau stérile ; l'émulsion obtenue est inoculée dans le péritoine d'un second cobaye.

Inoculation par scarifications et inoculation sous-cutanée. — L'inoculation par scarifications doit être pratiquée de préférence sur le dos ; l'inoculation sous-cutanée est pratiquée à la base de la cuisse. Dans le premier cas, il se produit un chancre au niveau du point d'inoculation; dans le second, on assiste à l'évolution d'un abcès et d'une lymphangite morveux ; les ganglions voisins se tuméfient et peuvent même s'abcéder. L'animal ne tarde pas à maigrir et succombe au bout d'un à deux mois.

Souvent, chez les cobayes mâles, il se produit une lésion fort caractéristique, le *sarcocèle* morveux; vers le second septénaire, les testicules deviennent énormes, la peau du scrotum d'abord rouge et tendue ne tarde pas à s'ulcérer; il s'y développe de petits chancres; la vaginale est primitivement intéressée, elle est envahie par le processus morveux, devient adhérente au testicule et s'infiltre de petits abcès miliaires.

Le poumon, le foie, la rate, les ganglions sont plus ou moins envahis par de petits tubercules miliaires à centre purulent.

Inoculation intrapéritonéale. — L'inoculation doit être pratiquée sur un cobaye mâle; la lésion pathognomonique est le développement d'un sarcocèle morveux le deuxième ou le troisième jour après l'inoculation ; la mort arrive très rapidement, d'ordinaire au cours de la deuxième semaine ; quand le virus est très actif (cultures par exemple) et que l'on injecte une dose un peu forte, la mort peut survenir en deux ou trois jours sans lésions nodulaires, mais par septicémie.

Souris des champs. — Cet animal est très sensible à la morve ; à la suite de l'inoculation sous-cutanée, la mort survient au cours de la première semaine. Les viscères et particulièrement la rate sont gorgés de granulations morveuses.

Spermophile. — Très sensible à la morve ; succombe pendant la première semaine avec généralisation viscérale.

Gamaléia a montré que les passages en série chez le spermophile exaltent la virulence du bacille de la morve ; le bacille ainsi exalté tue en 2 à 3 jours par un processus septicémique.

Chat. — Le chat est très sensible à la morve ; à la suite de l'inoculation cutanée, il se produit un chancre; la mort survient en 15-30 jours ; les viscères sont envahis par les nodules morveux.

Chien. — Avec le chien, nous abordons une catégorie d'animaux moins sensibles à la morve que les précédents. Le chien prend difficilement la morve. Chez le jeune chien seul, la maladie se généralise et la mort arrive rapidement (Galtier). Mais l'inoculation cutanée par le procédé des scarifications entraine chez le chien adulte le développement d'une lésion locale caractéristique. On pratique l'inoculation sur le front ; au bout de trois à cinq jours, la région s'œdématise et il se produit des ulcérations, entourées d'une auréole de congestion ; on se trouve en présence de chancres morveux d'où s'écoule une sanie très virulente. Les chancres progressent une à deux semaines, puis restent stationnaires et se cicatrisent enfin. La guérison est alors complète. Cependant Nocard a observé chez le chien des cas de mort par morve chronique.

On peut néanmoins vaincre la résistance du chien vis-à-vis du bacille morveux.

1° Trasbot inocule à deux chiens du pus provenant d'un lion morveux et voit succomber les deux animaux ; il en conclut que le passage par le lion exalte la virulence du bacille.

2° Straus injecte dans une veine une dose massive de culture morveuse ; l'animal maigrit, présente du farcin (nodosités sous-cutanées, chancres) et succombe avec envahissement de ses organes par les tubercules morveux.

3° Tedeschi a triomphé de la résistance du chien en pratiquant l'inoculation des cultures dans le tissu nerveux (cerveau, moelle, nerfs).

Lapin. — Le lapin est très peu réceptif : d'ordinaire l'inoculation sous-cutanée entraîne le développement d'un chancre qui guérit spontanément. Löffler a pu obtenir une infection généralisée et la mort par injection intraveineuse de cultures à doses massives. Gamaléia, par les passages en séries sur le spermophile, a obtenu un virus tuant le lapin par injection sous-cutanée.

Souris blanche, Rat. — Sont réfractaires à la morve.

Bovidés, Suidés. — Sont réfractaires à la morve. Spinola cependant a réussi à infecter le porc ; et Cadéac et Mallet ont montré que cet animal devient réceptif quand sa résistance a été affaiblie par une maladie antérieure.

Oiseaux. — Sont réfractaires à la morve.

RÉPARTITION DU BACILLE DANS L'ORGANISME MORVEUX.

Le pus morveux, la sanie des chancres, le jetage contiennent le bacille de Löffler-Schütz. On trouve de même le bacille dans les boutons, tubercules, infarctus morveux.

Le système lymphatique est le siège d'élection du bacille, les ganglions sont d'ordinaire rapidement envahis, mais il faut savoir que ce n'est pas là une règle absolue et que Nocard a constaté que les ganglions tuméfiés de l'auge n'étaient pas toujours virulents.

Chez l'animal, on ne trouve pour ainsi dire jamais le bacille morveux dans le sang (Nocard); cependant dans ces formes très aiguës les inoculations ont permis à Lixteyn et à Preusse d'y déceler sa présence. Chez l'homme, le microbe se trouve moins rarement dans le sang (Löffler, Goutchakoff, Sittmann).

La salive, les urines, le sperme, la sueur ont été quelquefois trouvés très virulents ; le lait ne le serait dans aucun cas.

En tous cas, la recherche du bacille par l'examen microscopique donnera souvent des résultats négatifs, même dans les frottis de

pus et de tubercules morveux ; l'inoculation et l'ensemencement seuls permettent d'affirmer la présence ou l'absence du bacille de Löffler. Cette impuissance de l'examen microscopique à révéler la présence du bacille est surtout marquée dans les lésions chroniques (particulièrement chez le cheval); pour obtenir des préparations démonstratives, on devra avoir recours au pus des chancres du chien, du sarcocèle morveux du cobaye, aux lésions aiguës de l'âne, etc.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC.

Le diagnostic de la morve est souvent malaisé ; l'expérimentation est souvent appelée à venir en aide à la clinique.

Le diagnostic précoce dans les cas de morve latente était impossible il y a encore peu d'années ; aujourd'hui nous possédons un agent précieux de diagnostic dans l'emploi de la malléine, sur laquelle nous aurons à revenir plus loin.

Pour le moment, nous indiquerons seulement la marche à suivre quand on veut rechercher la présence du bacille de la morve dans un produit pathologique.

I. **Examen microscopique**. — L'examen sera pratiqué sur des frottis préparés avec le pus, les sanies, les pulpes d'organes, etc. Ces frottis seront colorés par les méthodes que nous exposerons plus loin. Le bacille de la morve ne prend pas le Gram. Les fragments d'organes destinés à être coupés seront durcis à l'alcool absolu et inclus à la paraffine. Nous n'avons pas à revenir sur ce que nous avons dit plus haut sur le peu de valeur des résultats négatifs de l'examen microscopique.

II. **Cultures**. — Le pus, les pulpes d'organes, recueillis purement, seront toujours ensemencés sur pomme de terre. L'aspect de la culture du bacille de Löffler-Schütz sur pomme de terre est absolument caractéristique et constitue un important élément de diagnostic. Les ensemencements devront toujours être pratiqués en surface sur plusieurs pommes de terre pour isoler les germes qui pourraient exister dans le produit à l'état d'impureté.

III. **Inoculations**. — Avant la découverte de la propriété que possède la malléine de provoquer une réaction chez les animaux morveux, les inoculations pratiquées avec le pus, le jetage, etc., étaient le procédé le plus certain de diagnostic de la morve. Nous avons dit que les inoculations de ganglions pouvaient rester négatives, même quand le cheval porteur de ces ganglions est réellement atteint de morve. Les inoculations dans le but de poser le diagnostic se font au cobaye, à l'âne et au chien.

1° *Cobaye.* — L'inoculation des produits suspects dans le péritoine du cobaye a été recommandée par Straus comme le moyen le plus simple et le plus certain de diagnostiquer la morve. Ce procédé exige l'emploi de produits purs, ne contenant pas les microbes de la suppuration ou d'autres bactéries capables de déterminer une péritonite chez le cobaye.

Si l'on a affaire à des produits souillés, on pourra opérer comme nous l'avons dit plus haut : l'inoculation sera d'abord faite sous la peau d'un cobaye et une parcelle de ganglion de cet animal servira à pratiquer les inoculations intrapéritonéales. Mais il est souvent plus aisé et plus rapide, en pareil cas, de pratiquer les inoculations chez l'âne ou le chien. Dans la moitié des cas environ, les cobayes inoculés dans le péritoine avec du jetage suspect, meurent en vingt-quatre à trente-six heures par péritonite septique.

Pour pratiquer l'inoculation, un peu de pus, de jetage ou de suc glandulaire est délayé dans de l'eau stérile, puis injecté dans le péritoine : le *sarcocèle morveux caractéristique* apparaît dès le deuxième ou troisième jour; la mort survient du huitième au quinzième jour.

Le signe de Straus a passé longtemps pour pathognomonique ; le développement chez le cobaye du sarcocèle morveux après inoculation intrapéritonéale d'un produit pathologique était considéré comme une preuve absolue de la nature morveuse de ce produit. Mais Kutscher a isolé du jetage d'un cheval morveux un microbe très différent du bacille de Löffler-Schütz, et dont l'inoculation intrapéritonéale provoque chez le cobaye une orchite cliniquement semblable à l'orchite morveuse ; Hallopeau et Bureau ont obtenu une orchite semblable en inoculant dans le péritoine du cobaye le pus provenant d'un homme atteint de mycosis fongoïde. Nocard enfin a observé chez le cheval 19 cas de lymphangite d'apparence farcineuse et dus à un bacille dont l'inoculation intrapéritonéale chez le cobaye produit le sarcocèle : or, ce bacille n'a rien de commun avec celui de la morve ; il en diffère par la forme des cultures et par sa propriété de prendre très bien le Gram ; d'ailleurs, la lymphangite pseudo-farcineuse de Nocard semble très peu contagieuse. L'inoculation dans le péritoine du cobaye n'est donc qu'un élément du diagnostic ; elle doit toujours être suivie de l'examen microscopique du pus du sarcocèle et être accompagnée de l'épreuve par la malléine (Nocard).

Ane. — La sensibilité de l'âne en fait un réactif précieux pour le diagnostic de la morve. On inocule par la méthode des stries, comme nous l'avons dit plus haut ; quand le produit inoculé est de nature morveuse, l'âne présente toujours les symptômes caractéristiques de la morve avant la fin du deuxième septénaire ; cependant, dans un cas d'Arloing, l'âne inoculé avec le produit suspect ne présenta aucun symptôme de morve ; on le sacrifia au

bout de trois mois et on trouva, à l'autopsie, des lésions de morve chronique.

Chien. — L'inoculation de produits morveux par scarification sur la peau du front, entraîne d'ordinaire le développement de chancres morveux, mais cette réaction ne présente pas une constance suffisante pour qu'on puisse l'adopter comme signe certain dans le diagnostic.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Le bacille de la morve a l'aspect de petits bâtonnets droits ou légèrement incurvés. Ils ont à peu près la taille des bacilles tuberculeux (3 à 5 $\mu \times$ 0,5 à 1 μ), mais sont plus épais que ces derniers. Leurs extrémités sont arrondies. Ils sont mobiles dans les cultures en milieux artificiels. Dans les cultures, ils sont isolés ou quelquefois associés par deux; dans les tissus et le pus, on les rencontre quelquefois en petits amas. Dans les vieilles cultures, on voit des formes d'involution : bacilles larges, irrégulièrement renflés, et chaînettes de grains analogues à des coccus.



Fig. 175. — Bacille de la morve (sarcocèle morveux, frottis). Thionine phéniquée (Reich., Obj. 1/12, Oc. III).

Coloration. — Le bacille de Löffler-Schütz se colore par les couleurs basiques d'aniline, mais il a peu d'affinité pour les solutions aqueuses de ces couleurs ; pour obtenir de bonnes préparations, on doit employer des solutions mordancées et de préférence le bleu de Löffler, le bleu de Kühne, la thionine, le violet phéniqué, la fuchsine de Ziehl, etc. Il ne prend pas le Gram.

Dans les préparations colorées, le bacille présente un aspect granuleux, son protoplasma fixe irrégulièrement la matière colorante et présente des espaces incolores ; ces parties incolores ne correspondent pas à des spores.

Coupes. — Pour colorer le bacille dans les coupes, on peut utiliser le procédé au tannin de Nicolle ou un des procédés suivants :

Procédé de Kühne. — 1° Les coupes au sortir de l'alcool sont lavées à l'eau, puis colorées pendant quelques minutes dans le bleu phéniqué (Voy. p. 140).

2° Traiter les coupes très rapidement par la solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100.

3° Laver à l'eau.

4° Déshydrater très rapidement par l'alcool et l'huile d'aniline ; laver avec soin au xylol.

5° Monter dans le baume.

Procédé de Löffler. — 1° Colorer pendant quelques minutes dans de la fuchsine anilinée (préparer comme le violet aniliné) et additionnée de 1 p. 10 000 de potasse caustique.

2° Laver rapidement dans l'acide acétique à 1 p. 100.

3° Laver à l'eau.

4° Déshydrater très rapidement par l'alcool et l'huile d'aniline ; laver avec soin au xylol.

5° Monter dans le baume.

CULTURES.

Conditions de culture. — Le bacille de la morve est aérobie ; il ne cultive guère qu'à partir de + 25^c, sauf sur la gélose glycérinée ou la gélose additionnée de blanc d'œuf où il donne un développement grêle à partir de 23^c-24^c ; la culture s'arrête à partir de + 42^c. La température optima est de 35^c-38^c.

Bouillon. — A 37^c, dès la vingt-quatrième heure, trouble du milieu, puis formation d'un précipité blanc, muqueux. Cette culture n'a rien de caractéristique.

Gélose. — Gélose glycérinée. — Dès la vingt-quatrième heure, la culture apparait le long de la strie d'inoculation. Cette culture a d'abord l'aspect d'une mince bande blanchâtre, à demi transparente, puis elle s'épaissit, devient opaque.

Sur la gélose glycérinée, le développement est plus abondant, la culture peut envahir toute la surface du milieu de culture.

Sérum solidifié. — Le bacille se développe mieux sur le sérum du cheval que sur celui du bœuf. Dès le deuxième jour apparaissent des colonies jaunâtres semi-transparentes, qui deviennent blanches et opaques en vieillissant.

Gélatine. — Sur de la gélatine à 12 ou 15 p. 100 restant solide à + 25^c on obtient une culture très grêle, à peine visible après plusieurs jours d'exposition à + 25^c.

Pomme de terre. — La culture sur pomme de terre a un aspect absolument caractéristique ; elle se fait mieux sur les pommes de

terre riches en amidon ; il est bon aussi d'alcaliniser préalablement les pommes de terre (Voy. p. 52).

Dès le deuxième jour à 37°, apparait le long de la strie d'inoculation un enduit épais et visqueux de teinte jaunâtre; les jours suivants, la culture s'étend, devient brune et prend finalement une teinte chocolat clair; autour d'elle, la pomme de terre devient noirâtre.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le bacille de la morve est très fragile. Les cultures meurent dès la fin du premier mois.

Les cultures sont stérilisées par une exposition de quelques minutes à + 60° et même à + 55°.

Dans le pus, la dessiccation tue rapidement le bacille : du pus morveux étalé en couche mince et abandonné quarante-huit heures à la température ordinaire perd toute virulence. Dans la profondeur des organes, le bacille résiste mieux; une exposition de quelques minutes à + 100° le tue toujours dans le pus et les viscères.

Le bacille de Löffler-Schütz est très sensible à l'action des antiseptiques, le sublimé acide à 1 p. 1000, les solutions d'acide phénique, de crésyl à 3 ou 4 p. 100 le tuent en quelques minutes.

Virulence. — Dans les cultures, la virulence du bacille de la morve disparaît dès le huitième jour.

Dans les cultures en série sur les milieux artificiels, la virulence disparaît assez rapidement; elle est très amoindrie dès le cinquième ou le sixième passage.

On obtient facilement l'exaltation du bacille morveux par les inoculations en série chez certains animaux.

Trasbot a cité des faits semblant prouver l'exaltation du virus par le passage chez le lion.

Gamaléia a obtenu une exaltation considérable de la virulence du bacille par les passages chez le spermophile : le bacille devient capable de tuer l'animal en deux à trois jours par septicémie.

Protopopoff a exalté la virulence du bacille par les passages en série chez le lapin; au bout de plusieurs passages, la virulence se fixe et le bacille inoculé sous la peau tue invariablement le lapin en cinq à huit jours.

Léo est arrivé à rendre la souris blanche réceptive au bacille morveux en associant à l'inoculation une intoxication par la phloridzine; il alimente des souris, exclusivement avec des biscuits imbibés d'une solution alcoolique de phloridzine, puis desséchés;

'animal ainsi alimenté devient diabétique et succombe aisément à 'inoculation du bacille de la morve.

PRODUITS SOLUBLES.

Les cultures de bacille morveux virulent chauffées à 100° pour létruire le bacille jouissent de propriétés toxiques et sont capables l'entraîner la mort rapide des animaux auxquels on les inocule.

La toxine morveuse n'a pas été isolée; elle a été étudiée d'abord par Kalning et Helman, puis par Protopopoff, Roux et Nocard. On lésigne sous le nom de *malléine* un extrait des cultures en bouillon glycériné.

Préparation de la malléine (Nocard). — On se procure un irus exalté et fixé par plusieurs passages sur le lapin; ce virus est ensemencé dans du bouillon glycériné.

La culture est laissée pendant un mois à l'étuve à 37°, puis elle est stérilisée par un chauffage de trente minutes à 100°. On évapore le iquide au bain-marie au 1/10 de son volume primitif, on le filtre sur papier Chardin. Le filtrat brun, sirupeux, constitue la malléine brute.

A la dose d'un centimètre cube, cette malléine brute doit tuer le apin. La malléine brute traitée par plusieurs volumes d'alcool abandonne un précipité constitué par le principe actif mélangé à différentes matières étrangères.

Diagnostic de la morve par la malléine (Nocard). — Nocard a attiré l'attention sur une propriété remarquable de la malléine : njectée à très faible dose à des animaux morveux, elle détermine une réaction intense, analogue à celle que donne la tuberculine chez les tuberculeux; au contraire, à ces doses, elle est supportée sans accidents par les animaux sains. Quand on inocule sous la peau d'un cheval sain 1/4 de centimètre cube de malléine, celui-ci ne présente aucun phénomène particulier; au contraire, chez un cheval morveux, semblable injection entraîne une réaction violente caractérisée par de l'œdème au point d'inoculation, des frissons et une élévation notable de la température; cette élévation commence à se produire quelques heures après l'injection, peut atteindre 3° et 4° au bout de vingt-quatre heures et persiste plusieurs jours.

Toutes les fois qu'un animal réagit ainsi à la malléine, il est certain que cet animal est atteint de morve.

On conçoit combien ce procédé est précieux pour le diagnostic de la morve latente, alors qu'il n'existe ni chancres, ni jetage. Il n'est

pas applicable à l'homme, à cause même de l'intensité de la réaction.

Mais, dans quelques cas, en particulier quand l'animal a des lésions très avancées, la réaction peut ne pas se produire; il en est de même quand l'animal malade présente une température élevée, l'épreuve reste sans résultats quand l'animal a une température égale ou supérieure à 39°.

Quand l'injection amène une réaction très légère avec une élévation de température de 1° à 1°,5, l'épreuve reste douteuse ; il est bon de laisser l'animal au repos et de recommencer l'inoculation au bout de trois à quatre semaines.

C'est en raison de ces faits qu'il est nécessaire, quand cela est possible, de combiner toujours à l'épreuve par la malléine, l'ensemencement sur pomme de terre et l'inoculation dans le péritoine du cobaye des produits suspects : de ces trois ordres de recherches, on pourra toujours tirer les éléments d'un diagnostic certain.

Technique. — Dans la pratique vétérinaire, on substitue à la malléine brute, une malléine diluée plus facile à manier.

On prépare la solution suivante :

Eau phéniquée à 5 p. 100	9 parties
Malléine brute	1 partie

IMMUNITÉ.

Le cheval suspect est mis en observation pendant quarante-huit heures; on prend la température matin et soir (exclure les animaux fébricitants); le troisième jour, on injecte sous la peau de l'encolure 2^{cmc},5 de tuberculine diluée et, à partir de ce moment, on prend la température deux à trois fois par jour; l'élévation de température apparaît chez les animaux morveux dès la huitième ou dixième heure après l'injection.

I. — Straus a montré que l'on pouvait conférer la morve au chien en lui injectant dans les veines des cultures virulentes (Voy. p. 455); or, il a constaté que l'inoculation préalable de cultures vieillies préserve le chien contre l'infection morveuse généralisée consécutive à l'injection intraveineuse. Mais, chez les chiens ainsi immunisés contre l'infection, on peut encore produire des chancres morveux par inoculation cutanée. D'ailleurs, le chien inoculé à différentes reprises peut présenter jusqu'à cinq fois des chancres morveux (Galtier).

II. — Par la même méthode des inoculations préalables de cultures âgées, Sakaroff et Finger ont retardé un peu la marche de la morve expérimentale chez le lapin, mais ils n'ont jamais pu

empêcher la mort de l'animal. Les inoculations de cultures chauffées à 100° n'ont pas donné de meilleurs résultats entre les mains des mêmes auteurs.

III. — Sakaroff atténue la virulence du bacille par des passages par le chat; en injectant le bacille ainsi modifié à des chevaux, il aurait réussi à leur conférer l'immunité, mais il n'a pas inoculé de témoins, ce qui enlève toute valeur à ses expériences.

IV. — En injectant au cobaye du sérum de bovidés (naturellement réfractaires), Chenot et Picq auraient obtenu des effets préventifs et même thérapeutiques ; ce que l'on sait des propriétés du sérum des animaux réfractaires ne s'accorde guère avec ces résultats ; aussi ces expériences méritent-elles confirmation.

V. — D'après Babès, les injections de malléine permettaient de conférer une certaine immunité au cobaye, mais Nocard a démontré que la malléine ne possède aucune propriété immunisante.

CHAPITRE XXII

LE SPIRILLE DE LA FIÈVRE RÉCURRENTE

L'agent de la fièvre récurrente est un spirille découvert par Obermeier en 1868 ; c'est le premier microbe qui ait été rencontré dans une maladie purement humaine.

La fièvre récurrente ne sévit spontanément que sur l'homme ; on a pu l'inoculer au singe.

Le spirille se rencontre dans le sang pendant l'accès fébrile, on ne l'y trouve que très rarement et en très petite quantité pendant l'apyrexie; au moment de l'élévation précritique de la température, les spirilles disparaissent d'ordinaire du sang et on ne les retrouve plus que dans la rate où ils sont englobés par les leucocytes polynucléaires.

RECHERCHE ET MORPHOLOGIE DU SPIRILLE.

On recherche les spirilles dans le sang obtenu par piqûre du doigt, selon le procédé ordinaire (p. 189).

On examine immédiatement une gouttelette de sang à l'état frais (technique, p. 206), et on prépare avec d'autres gouttes des lamelles sèches (technique, p. 207).

État frais. — Dans le sang frais recueilli pendant la période fébrile, on voit entre les globules de nombreux spirilles longs de 15 à 40 μ, très minces, effilés aux extrémités et présentant chacun 8 à 10 spires; les spirilles sont très mobiles, se déplacent dans la préparation en écartant les globules soit en ligne droite par un mouvement oscillatoire, soit par un mouvement de vrille. Ces mouvements sont dus à l'action de quatre cils disposés par bouquets de deux à chaque extrémité du spirille ; ces cils sont difficilement colorables par le violet d'Ehrlich.

Les spirilles ne forment pas de spores ; ils se reproduisent par division transversale (Metchnikoff).

Coloration. — Le spirochète d'Obermeier se colore assez difficilement et exige l'emploi de méthodes spéciales.

Les lamelles de sang destinées à subir la coloration sont préparées par le procédé ordinaire, mais doivent être désséchées à l'air ou à l'étuve à 60°-70° sans jamais subir l'action directe de la flamme. Pour bien voir le parasite, on doit commencer par débarrasser les globules rouges de leur hémoglobine. Le procédé de choix est dû à Günther.



Fig. 176. — Spirille de la fièvre récurrente (sang). Procédé de Günther (Reich., Obj. 1/12 imm.; Oc. II).

Procédé de Günther. — 1° Dissoudre l'hémoglobine par l'acide acétique à 5 p. 100, puis faire agir les vapeurs d'ammoniaque (Voy. p. 210).

2° Colorer pendant huit à dix minutes dans le violet aniliné d'Ehrlich, laver à l'eau, sécher, monter dans le baume.

Les globules rouges sont incolores; seuls, les spirilles et les globules blancs sont teints en violet.

Non seulement la coloration permet de voir plus nettement les spirilles, mais, dans les préparations colorées, on aperçoit des spirilles beaucoup plus nombreux que dans les préparations de sang frais.

Coupes. — On peut colorer les spirilles dans les coupes de rate. Fixer des fragments de l'organe dans l'alcool absolu et inclure au baume. On colorera par le procédé de Nikiforoff.

Procédé de coloration de Nikiforoff. — 1° Colorer les coupes par un séjour de vingt-quatre à quarante-huit heures à la température ordinaire dans la solution suivante :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène.........	10 volumes
Eau distillée...	10 —
Solution alcoolique de tropéoline à 1 p. 100............	1 volume

2° Au sortir de la solution colorante, laver les coupes à l'eau distillée, puis à l'alcool-éther.

3° Éclaircir à l'essence de girofle et au xylol.

4° Monter dans le baume.

CULTURES.

Tous les essais de culture du spirille d'Obermeier ont échoué.

EXPÉRIMENTATION.

Carter et Koch ont montré que les singes de l'ancien continent peuvent contracter la fièvre récurrente par inoculation sous-cutanée du sang prélevé chez l'homme malade; chez le singe, la rechute caractéristique de la maladie de l'homme ne se produit pas.

Metchnikoff a étudié chez le singe les phénomènes consécutifs à l'inoculation des spirilles.

Pendant l'accès, les spirilles abondent dans le sang; ils sont toujours extra-cellulaires, jamais on ne les trouve englobés par les globules. Mais, dès l'élévation précritique les spirilles disparaissent du sang; par contre, ils fourmillent dans la rate. Dans la rate, après l'accès, les spirilles ont un siège intra-cellulaire, ils sont inclus dans les leucocytes polynucléaires : on trouve des amas irréguliers de ces leucocytes renfermant des spirilles et formant de petits abcès microscopiques. Ces amas leucocytaires peuvent devenir assez considérables pour constituer de véritables lymphomes inflammatoires (Ponfick, Soudakewitch).

Dans un même leucocyte, on peut rencontrer plusieurs spirilles; on note quelquefois autour des leucocytes des accumulations de spirilles disposés comme les rayons d'une roue; bientôt, à l'intérieur des cellules, les spirilles disparaissent, on ne trouve plus que des granulations irrégulièrement disposées et enfin la cellule reprend son aspect normal. Certaines cellules phagocytaires, au contraire, montrent un noyau nécrotique, ne fixant plus les colorants des noyaux; ici la cellule animale a succombé à la lutte contre le parasite.

Les spirilles sont englobés vivants par les leucocytes : un peu de la rate d'un animal sacrifié en période apyrétique (alors que tous les spirilles sont englobés) inoculé à un singe neuf lui confère la maladie; certains spirilles conservent donc leur virulence un certain temps après l'englobement, ce sont ces spirilles qui déterminent, par un phénomène assez obscur, le second accès chez l'homme.

Soudakewitch a mis en évidence, d'une façon irréfutable, le rôle de la rate dans la fièvre récurrente. Il pratique chez des singes l'ablation de la rate, puis leur inocule la fièvre récurrente; ces animaux succombent alors fatalement à la maladie : le nombre des spirilles augmente d'instant en instant dans le sang et arrive à dépasser celui des globules, la phagocytose ne se produit pas et l'animal succombe.

SÉROTHÉRAPIE.

Gabritchewsky a constaté que le sang du singe, après la cessation de l'accès, était bactéricide *in vitro*; il mêle à une goutte de sang prélevé chez un malade pendant l'accès et contenant de nombreux spirilles une goutte de sérum provenant d'un singe en apyrexie : au bout d'une à quatre heures, les spirilles deviennent immobiles, renflés, « en un mot, complètement modifiés »; au contraire, le

mélange du sérum normal laisserait les spirilles vivants pendant quatre-vingts à cent soixante heures.

Mais, selon la remarque de Metchnikoff, la propriété bactéricide du sang, dans les recherches mêmes de Gabritchewsky, s'est montrée très variable, et, à côté des chiffres de une, deux, quatre heures, on trouve, avec le même sang, ceux de cent dix-sept et cent dix-huit heures. Metchnikoff a vu les spirilles garder leur mobilité pendant sept heures après mélange à une forte quantité de sang retiré d'un malade après la crise. L'existence de la propriété bactéricide du sang *in vitro* ne doit donc être admise que sous certaines réserves, et l'on ne peut s'associer à l'hypothèse formulée par Gabritchewsky que les spirilles sont détruits dans le plasma sanguin au moment de la crise, hypothèse qui n'est basée sur aucune observation directe; pas davantage, on ne peut considérer comme démontrée cette conclusion que l'état réfractaire est lié à l'existence du pouvoir bactéricide du sang.

Enfin Gabritchewsky a obtenu chez un singe une défervescence rapide, en quarante-huit heures (un singe témoin fut malade soixante-douze heures et eut un deuxième accès), par l'injection du sérum d'un autre singe ayant fait sa défervescence. On ne peut encore généraliser les résultats de cette unique expérience.

CHAPITRE XXIII

LE VIBRION DU CHOLÉRA

Le choléra asiatique est produit par le *vibrion* ou *bacille virgule* découvert par Koch.

Le vibrion du choléra est essentiellement polymorphe; il en existe un grand nombre de variétés s'écartant plus ou moins du type décrit par Koch. Si l'on ajoute que, dans les eaux, les fèces des sujets sains, etc., on trouve fréquemment des vibrions morphologiquement analogues sinon identiques à celui du choléra, on comprendra combien, en dehors des grandes épidémies, le diagnostic du vibrion de Koch est difficile et aléatoire.

Le vibrion de Koch se rencontre dans le contenu intestinal et les déjections des cholériques; on le trouve rarement dans les matières vomies. Le vibrion reste localisé dans l'intestin et y sécrète une toxine qui cause les symptômes du choléra.

INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES.

I. — PÉRITONITE CHOLÉRIQUE.

L'inoculation d'une culture du vibrion de Koch dans le péritoine du cobaye est susceptible de conférer à cet animal une péritonite vibrionienne (Pfeiffer) rapidement mortelle, mais qui n'a aucun rapport avec le choléra intestinal de l'homme. D'ailleurs, la virulence des vibrions est excessivement variable. Certains vibrions ne provenant pas de cas de choléra humain produisent la péritonite chez le cobaye, tandis que des vibrions récemment isolés de l'intestin de cholériques peuvent se montrer absolument inactifs vis-à-vis de cet animal. L'aptitude à produire la péritonite vibrionienne ne saurait donc en aucun cas être considérée comme une propriété caractéristique du vibrion de Koch.

Pour produire la péritonite cholérique, on devra s'adresser à une culture sur gélose; la totalité ou une portion de cette culture

suivant la virulence) est délayée dans un centimètre cube de bouillon stérile et injectée dans le péritoine. Peu d'heures après l'inoculation se manifestent les symptômes morbides : l'animal devient somnolent, la température centrale s'abaisse rapidement, le collapsus s'établit, des convulsions surviennent et la mort termine la scène. A l'autopsie, la cavité péritonéale contient un exsudat abondant renfermant une quantité variable, mais d'ordinaire peu considérable, de vibrions; l'intestin distendu présente la teinte hortensia, son contenu renferme des bacilles virgules en petit nombre; on ne constate pas de lésions des viscères; les vibrions peuvent se généraliser dans le sang avec lequel on obtient alors une culture pure de ces microbes. Les passages successifs par le péritoine des cobayes augmentent la virulence du vibrion ; cette virulence semble fixée vers le vingtième passage.

II. — INOCULATION SOUS-CUTANÉE.

L'infection du cobaye et du lapin par la voie sous-cutanée n'est possible qu'avec des vibrions très virulents; elle a été réalisée avec les vibrions de Massaouah, d'Angers, etc. L'animal succombe plus ou moins rapidement à la septicémie vibrionienne, après avoir présenté une hypothermie progressive avec des convulsions et du collapsus. Le sang, la pulpe des viscères fournissent des cultures pures de vibrion.

Le spermophile est beaucoup plus sensible que le cobaye à l'inoculation du vibrion du choléra.

III. — INOCULATION INTRA-MUSCULAIRE.

Le cobaye est en général plus sensible à l'inoculation intra-musculaire qu'à l'inoculation sous-cutanée.

On a donné longtemps comme un caractère distinctif du vibrion du choléra qu'il n'était pas pathogène pour le pigeon. Gamaleia, Metchnikoff ont montré que beaucoup de vibrions cholériques légitimes étaient pathogènes pour cet animal; l'inoculation du vibrion d'Angers, par exemple, dans le muscle pectoral du pigeon, tue rapidement cet animal par septicémie.

IV. — CHOLÉRA INTESTINAL.

Les symptômes produits par l'inoculation sous-cutanée ou intra-péritonéale du vibrion n'ont rien de commun avec ceux du choléra

véritable. Les essais d'inoculation par les voies digestives n'ont, pendant longtemps, fourni aucun résultat satisfaisant; les récentes recherches de Metchnikoff ont fait faire un grand pas à l'étude du choléra intestinal expérimental.

Animaux.

I. — L'ingestion de cultures de vibrion et de selles cholériques restant sans action sur les animaux, Nicati et Riestch pensèrent à pratiquer directement l'inoculation dans l'intestin et injectèrent les cultures dans le duodénum du cobaye, après laparotomie; les premiers ils obtinrent un choléra intestinal expérimental.

II. — Koch arrive aux mêmes résultats en utilisant la technique suivante : il place une sonde dans l'œsophage du cobaye et injecte dans l'estomac quelques centimètres cubes d'une solution de carbonate de soude à 2 p. 100; quelques minutes après il injecte dans l'estomac la culture de vibrion et dans le péritoine ou sous la peau 1 à 1^{c},5 de teinture d'opium. Les animaux tombent bientôt en somnolence puis reviennent à l'état normal au bout de une à deux heures. Vers la douzième heure qui suit l'inoculation le collapsus s'établit, des selles diarrhéiques se produisent, la température s'abaisse progressivement et la mort survient au bout de vingt-quatre à soixante-douze heures. A l'autopsie, l'intestin grêle est distendu, congestionné et contient un liquide aqueux présentant des flocons crémeux; ce liquide renferme de très nombreux vibrions qui s'y trouvent presque en culture pure; les coupes de l'intestin montrent que les vibrions en ont pénétré les parois.

III. — Doyen a modifié légèrement le procédé de Koch; il substitue à la teinture d'opium de l'alcool à 40° à la dose de 1^{cc},6 à 1^{cc},8 par 100 grammes du poids de l'animal et obtient les mêmes résultats qu'avec la teinture d'opium : c'est donc l'alcool qui agit dans cette teinture.

IV. — Zabolotny a montré que le spermophile est très sensible à l'ingestion du vibrion cholérique. Quand on nourrit des spermophiles avec des aliments arrosés de quelques gouttes d'une culture pure de vibrion, la moitié des animaux ainsi traités prennent le choléra et meurent, les autres résistent. La mortalité est plus grande si on mêle un sel alcalin à la nourriture contaminée, mais quelques individus résistent cependant. Les animaux infectés présentent de la faiblesse, de l'hypothermie, fréquemment de la diarrhée, parfois des crampes, de la cyanose du nez et de la langue. A l'autopsie, le tube intestinal est distendu, hyperhémié et contient un liquide riche en

vibrions; souvent ces vibrions envahissent le péritoine et le sang. Malheureusement le spermophile est un animal que l'on se procure difficilement et qui ne se reproduit pas en captivité; il ne saurait donc être d'un grand secours pour l'étude du choléra expérimental.

V. — Metchnikoff, partant de cette idée qu'une large part de l'immunité des animaux contre le choléra intestinal est due à l'influence des microbes du canal digestif, cherche à supprimer ou à diminuer cette influence. Il s'adresse au jeune lapin, qui ne se nourrit que du lait de sa mère pendant plusieurs semaines et dont la flore intestinale reste longtemps assez pauvre et peu variée. Avec l'extrémité recourbée d'une pipette, Metchnikoff racle une culture de vingt-quatre heures sur gélose (choléra de Massaouah) et l'introduit dans la bouche de jeunes lapins : dans la moitié des cas, les animaux ainsi inoculés succombent au choléra intestinal ; il se produit de la diarrhée et la mort arrive vers le sixième jour ; à l'autopsie les animaux présentent les lésions du choléra ; le contenu de l'intestin renferme de nombreux vibrions.

VI. — Metchnikoff a établi que, dans les cultures sur plaques de gélatine, certains microbes favorisaient le développement des vibrions du choléra et que d'autres microbes, au contraire, empêchaient ce développement. Metchnikoff a reconnu des propriétés favorisantes particulièrement à trois microbes isolés de l'estomac de l'homme : une sarcine blanche, une torula et un bacille du groupe des coli-formes. Le vibrion de Massaouah ingéré en commun avec des cultures de ces microbes favorisants a provoqué un choléra mortel chez la presque totalité des jeunes lapins inoculés (20 sur 22) ; la mort survient d'ordinaire trente-six à quarante-huit heures après l'injection, parfois seulement vers la soixantième à cent-vingtième heure, rarement après la deux-centième heure. Les animaux infectés présentent une diarrhée liquide, incolore, séreuse, avec des grumeaux de mucus ; il ne se produit pas de vomissements, mais on note fréquemment de l'anurie; les parois abdominales sont molles et flasques, le lapin devient triste et immobile, sa température s'abaisse jusqu'à 30° et au-dessous, et la mort arrive après une agonie parfois fort longue. — A l'autopsie, on ne constate aucune lésion des viscères thoraciques ou abdominaux ; seul l'intestin grêle est hyperhémié, présente une teinte hortensia et est distendu par un liquide louche, glaireux ; le cæcum renferme une grande quantité de sérosité louche contenant des flocons muqueux et présentant une réaction alcaline. Le liquide de l'intestin grêle contient une énorme quantité de vibrions, le plus souvent en culture pure. Les microbes ingérés en même temps que

le vibrion disparaissent quand ils ont accompli leur rôle favorisant. Le vibrion passe dans le sang dans un quart des cas.

Un vibrion isolé des eaux de Versailles et virulent pour le cobaye (inoculation intra-péritonéale) s'est comporté de la même façon que le vibrion de Massaouah vis-à-vis des jeunes lapins.

Dès que les jeunes lapins cessent de s'alimenter exclusivement de lait, leur réceptivité disparaît et il s'établit une immunité que ne peut vaincre l'association des microbes favorisants. Le choléra intestinal des jeunes lapins est contagieux et peut se transmettre par l'intermédiaire des mamelles de la mère souillées pendant la tetée par les animaux infectés.

Les jeunes cobayes âgés de quelques jours sont beaucoup moins sensibles que les lapins à l'action du vibrion de Massaouah ingéré avec les microbes favorisants ; le choléra intestinal qu'ils prennent est moins caractéristique que celui des lapins et le vibrion a une tendance plus grande à se généraliser dans l'organisme du cobaye.

Homme.

Depuis longtemps des expérimentateurs ont tenté de produire le choléra chez l'homme par ingestion de matières fécales cholériques (Bochefontaine, Klein).

En 1892, Pettenkofer et Emmerich absorbent des cultures pures de vibrion de Koch ; malgré l'ingestion préalable de carbonate de soude et la réalisation d'écarts de régime, ils n'obtiennent qu'une diarrhée cholériforme sans accidents généraux.

Hasterlik et Stricker, Ferran, purent de même déterminer des diarrhées et des vomissements par l'ingestion de cultures pures de vibrion.

Metchnikoff, à différentes reprises, ingéra et fit ingérer à ses élèves des cultures pures de vibrions de différentes provenances (vibrions de Hambourg, Courbevoie, Saint-Cloud, Paris, Versailles, etc.). Le patient commençait par avaler un gramme de bicarbonate de soude dissout dans un peu d'eau et, immédiatement après, il ingérait une quantité variable de culture sur gélose émulsionnée dans un peu de bouillon stérile. Metchnikoff obtint ainsi des diarrhées riziformes caractéristiques et « un vrai choléra asiatique qui, quoique léger, présenta tous les symptômes classiques » (diarrhée riziforme, hypothermie, vomissements, crampes des mollets, anurie, vibrions en culture à peu près pure dans les selles).

Il ne semble exister aucun rapport entre la propriété d'un vibrion de développer la péritonite cholérique chez le cobaye et la propriété de déterminer le choléra intestinal.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Les vibrions sont essentiellement polymorphes ; il en résulte une certaine difficulté dans leur étude et leur recherche. Jamais on ne devra baser un diagnostic sur l'observation d'un seul caractère : la forme des vibrions, le nombre de leurs cils, la manière dont ils se comportent dans les différents milieux sont sujets à de nombreuses variations.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le vibrion de Koch a la forme d'un bâtonnet trapu, long de 1,5 à 3 μ, large de 0,5 à 0,6 μ, légèrement incurvé en virgule ; le degré d'incur-



Fig. 177. — Vibrion du choléra. Culture sur gélose. Fuchsine de Ziehl diluée (Reich., Obj. 1/12 im. ; Oc. II).

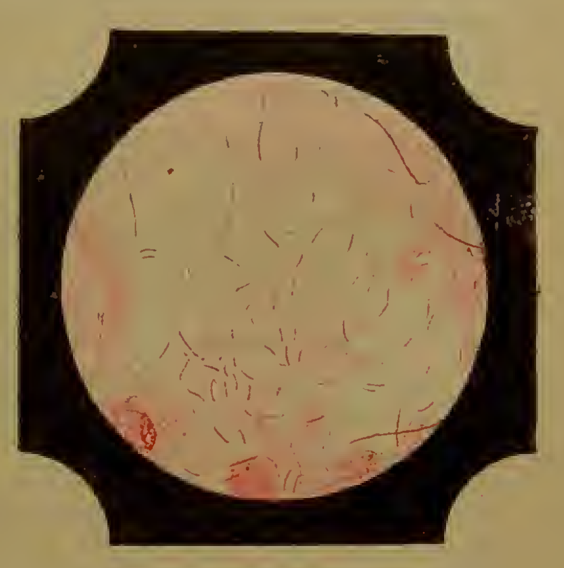


Fig. 178. — Vibrion du choléra (Massaouah). Frottis avec le contenu intestinal. Fuchsine de Ziehl diluée (Reich., Obj. 1/12 im ; Oc. II).

vation est très variable ; dans le champ du microscope un certain nombre de vibrions paraissent rectilignes, ce sont ceux dont le plan de courbure est perpendiculaire à la surface de la lame, l'œil n'en voit que la projection sur le plan de la lame et la courbure disparaît. Le vibrion est très mobile et possède des cils vibratiles.

Mais il existe d'autres variétés de vibrions s'écartant notablement du type de Koch. Les uns sont minces, irrégulièrement incurvés et présentent parfois la forme d'un S allongé (vibrions de Massaouah, de Courbevoie, de Paris, d'Angers). D'autres vibrions sont rectilignes et ne présentent jamais d'incurvation (vibrion de Shangaï) ; d'autres

encore très petits, coccobacillaires (vibrion de Malte). Bien plus, Metchnikoff, en réensemençant une vieille culture en eau peptonisée de vibrion d'Angers, vibrion d'ordinaire trapu et recourbé, a obtenu une forme mince et allongée.

Dans les cultures âgées de plusieurs jours on trouve de nombreuses formes d'involution; beaucoup de vibrions sont irrégulièrement renflés, à côté d'eux on voit des éléments arrondis, de volume variable. Certains de ces corps sphériques correspondraient d'après Hueppe à des formes de résistance, ce seraient des arthrospores formées par enkystement des vibrions; ces arthrospores ne sont pas plus résistantes que le vibrion lui-même.

Coloration. — Les vibrions se colorent un peu plus difficilement que les bacilles; on utilise pour les colorer des solutions mordancées un peu fortes : la fuchsine de Ziehl étendue de 3 à 4 fois son volume d'eau convient parfaitement. Les vibrions ne prennent pas le Gram.

Cils vibratiles. — Le nombre et la disposition des cils vibratiles sont très variables. Le vibrion type de Koch ne possède qu'un cil placé à une extrémité; Nicolle et Morax ont montré que certaines variétés présentaient 2, 3 ou même 4 cils placés plus ou moins régulièrement aux extrémités; une variété indienne étudiée par ces auteurs est immobile et ne présente pas de cils.

On peut colorer les cils à l'état vivant par le procédé de Straus, ou, après dessiccation, par les procédés recommandés au chapitre IX. Pour la recherche des cils on s'adressera toujours à de jeunes cultures sur gélose.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Conditions de culture. — Le vibrion du choléra est essentiellement aérobie; il donnerait cependant une culture très grêle dans les milieux privés d'air (Hueppe et Scholl). Il se développe de + 12^{c} à + 40^{c}, sa température optima de culture est + 37^{c}. Il cultive dans tous les milieux usuels, neutres ou légèrement alcalins.

Bouillon. — Eau peptonisée. — A 37^{c}, trouble rapide (dixième à douzième heure), puis formation à la surface d'un voile mince blanchâtre, très fragile; par la suite, il se produit un précipité floconneux.

Gélatine. — *Piqûre.* — A 20^{c} apparaissent dès la vingtième heure de petites colonies le long de la piqûre. Rapidement il se produit à la surface une petite cupule dans laquelle est retenue une bulle d'air. A partir de ce moment la liquéfaction s'accentue, elle progresse en entonnoir et est plus marquée à la surface qu'au fond du tube; la bulle d'air continue à exister à la surface (deuxième-quatrième jour,

culture caractéristique). Peu à peu la liquéfaction envahit tout le tube et la culture cesse d'être caractéristique.

Colonies isolées. — A + 20°, vers la vingtième heure apparaissent sur la plaque de petits points blanchâtres qui ne tardent pas à former des colonies irrégulières, granuleuses, à bords un peu sinueux, puis la liquéfaction commence, elle se produit en cupule ; au centre de la zone liquéfiée apparaît la colonie de la périphérie de laquelle se détachent de petits groupes de vibrions. Bientôt la plaque se liquéfie en totalité.

Gélose. — A 37°, strie abondante, blanchâtre, se développant rapidement et ne présentant pas de caractères spéciaux.

Sérum coagulé. — Le vibrion se développe rapidement en liquéfiant le milieu.

Pomme de terre. — Le vibrion ne se développe bien que sur une pomme de terre alcalinisée (Voy. p. 53), il forme alors une strie épaisse, brun clair. Sur la pomme de terre légèrement acide le développement est nul ou très grêle.

Lait. — Le vibrion cultive dans le lait sans le coaguler.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le vibrion du choléra garde assez longtemps sa vitalité dans les cultures conservées à l'obscurité et à l'abri de la dessiccation; dans ces conditions, les cultures en gélose sont encore vivantes après cinq ou six mois.

La dessiccation tue très vite le vibrion du choléra, surtout quand il est pris dans les cultures ; dans les matières fécales les vibrions résistent mieux.

Une température de + 50° à + 60° tue le vibrion du choléra en dix minutes environ, mais des températures très basses (— 10°) sont sans action sur sa vitalité.

Les vibrions sont très sensibles à l'action des antiseptiques : des traces de sublimé, de sulfate de quinine, etc., arrêtent leurs cultures.

Les vibrions cholériques sont des êtres très sensibles à l'influence des microbes qui les entourent (Metchnikoff) ; nous avons déjà vu que certaines bactéries favorisaient le développement des vibrions dans les cultures; il en est d'autres, au contraire, qui empêchent ce développement, tels sont le bacille pyocyanique, un coccus blanc isolé de l'eau, etc. Ce coccus blanc a une action remarquable sur les vibrions : pendant les premiers jours il en empêche complètement le développement, puis, au bout de quelque temps le vibrion commence à se développer, mais ses colonies sont rares et grêles e

constituées non par un bacille virgule, mais par des formes d'involution en doubles massues (Metchnikoff).

Réaction indol-nitreuse. — Dans les cultures en eau peptonisée le vibrion du choléra réduit les nitrates pour donner naissance à des nitrites et produit de l'indol. Quand on verse un acide minéral exempt de produits nitreux (de l'acide sulfurique pur, p. ex.) dans une de ces cultures il se produit une réaction rouge caractéristique, c'est la *réaction du kolera-roth* ou *indol-nitreuse* (réaction de Bujwid, de Salkowski). Cette réaction est encore plus apparente si on a soin d'ajouter un peu de nitrate de potasse dans l'eau peptonisée ; on peut utiliser la formule ci-dessous :

Peptone Chapoteau	10 grammes.
Sel marin	5 —
Nitrate de potasse	1 gramme (non indispensable).
Eau	1000 grammes.

La solution est alcaline sans addition de soude ; la stériliser à 115°.

Le tube d'eau peptonisée ensemencé avec le vibrion à étudier est placé à l'étuve à 37° ; au bout de vingt-quatre heures on y verse doucement 1 à 2 centimètres cubes d'acide sulfurique ou chlorhydrique purs : il se produit une teinte rose qui s'accentue pendant plusieurs heures.

Il faut savoir que tous les vibrions cholériques ne donnent pas la réaction indol-nitreuse et que, par contre, d'autres bactéries peuvent la fournir.

Réaction de l'indol. — Le vibrion du choléra produisant de l'indol dans les cultures, ces cultures donnent les réactions que nous avons énumérées page 376.

TOXINE.

Le choléra est un empoisonnement aigu causé par l'absorption d'une toxine élaborée dans l'intestin par le vibrion ; depuis longtemps on s'est préoccupé de l'étude de cette toxine. Nous ne nous occuperons ici que des travaux récents et laisserons de côté ceux dans lesquels on a recherché et décrit des ptomaïnes.

I. — Brieger et Frænkel décrivent dans les cultures une substance albuminoïde de nature indéterminée qu'ils rapprochent des diastases et nomment *toxalbumine* ; Outchinsky montre que le vibrion élabore

(1) Nous ne citerons que pour mémoire la théorie d'Emmerich qui voulait que l'intoxication cholérique soit produite par les nitrites élaborés par le vibrion ; il suffira de dire que les cultures des vibrions ne produisant pas de nitrites sont tout aussi toxiques que celles qui renferment ces sels.

cette toxine même dans un milieu exclusivement minéral composé de la façon suivante :

Eau	1000	grammes.
Glycérine	40	—
Chlorure de sodium	5	—
Chlorure de calcium	0,1	centigr.
Sulfate de magnésium	0,2	—
Phosphate de potassium	2	grammes.
Lactate d'ammonium	6	— .
Asparagine	4	—

II. — Petri montre que les cultures qui fournissent le plus de toxine sont celles qui sont faites dans une solution de peptone (solution à 5 ou 10 p. 100). Les cultures ainsi préparées et stérilisées à + 120° sont toxiques pour le cobaye. La toxine cholérique n'est pas détruite par la température de l'ébullition, sa nature diffère donc complètement de celle de la toxine diphtéritique, Petri la désigne sous le nom de toxopeptone. A la dose de 1 à 2 centimètres cubes injectés dans le péritoine du cobaye, la toxine de Petri produit une maladie mortelle en huit à vingt-quatre heures, débutant après une incubation de deux à trois heures et caractérisée par de la somnolence, de l'hypothermie et la production d'une péritonite à exsudat séreux. La culture entière stérilisée par la chaleur est plus active que la culture filtrée.

III. — Hueppe et Scholl objectent aux travaux précédents que dans l'intestin humain le vibrion prépare sa toxine à l'abri de l'air : les cultures aérobies sont donc impuissantes à fournir la véritable toxine cholérique. Hueppe et Scholl cultivent le vibrion à l'intérieur d'œufs de poule (Voy. p. 51), croyant le placer dans des conditions de vie anaérobie, oubliant la présence de la chambre à air et la porosité de la coquille. La culture développée, les auteurs précipitent le contenu de l'œuf par l'alcool, ils dissolvent le précipité dans de l'eau stérile et injectent la solution obtenue dans le péritoine de cobayes. Cette solution se montre extrêmement toxique et tue les animaux en quelques minutes, sans période d'incubation. Gruber et Wiener montrent que cet empoisonnement n'a rien de spécifique et est produit par l'hydrogène sulfuré développé dans la culture et l'alcool employé à la précipitation. Gruber et Wiener confirment les résultats de Petri : la véritable toxine cholérique ne tue les animaux qu'après une période d'incubation.

IV. — Gamaléia soutient l'existence de plusieurs toxines cholériques. Des cultures de vibrion dans du bouillon de pied de veau sont placées pendant quinze jours à l'étuve à 37°, puis abandonnées quelques jours à la température ordinaire pour que le poison con-

tenu dans le corps des microbes diffuse dans le liquide. Ce liquide de macération contiendrait deux poisons, l'un altérable par la chaleur et provoquant de la diarrhée chez les lapins, l'autre résistant au chauffage et tuant les lapins sans provoquer de diarrhée.

V. — Pour Pfeiffer, la toxine cholérique est adhérente au corps même des vibrions et n'est mise en liberté que lorsque ceux-ci sont morts ou se désagrègent; il en résulte que les toxines solubles rencontrées dans les cultures ne seraient qu'un produit plus ou moins modifié des cadavres microbiens. Pfeiffer base son affirmation sur ce fait que l'on tue le cobaye en lui injectant dans le péritoine les vibrions d'une culture récente sur gélose tuée par les vapeurs de chloroforme ou la chaleur.

VI. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni démontrent que la toxine cholérique est soluble et qu'elle diffuse pendant la vie des vibrions. Ils préparent une toxine qui est analogue à celle que Ransom a obtenue de son côté.

Préparation de la toxine. — 1° Il faut commencer par se procurer un vibrion très virulent. Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni exaltent la virulence de leur vibrion par des passages successifs par le péritoine du cobaye : ils arrivent à obtenir un vibrion tuant le cobaye à la dose de 1/20 de culture sur gélose (inoculation intrapéritonéale). Les mêmes auteurs donnent la préférence au procédé suivant : on prépare de petits sacs de collodion de 3 à 4 centimètres cubes de capacité; après avoir stérilisé un de ces sacs on y introduit de l'eau peptonisée ensemencée avec le vibrion et on en referme avec soin l'ouverture. On introduit aseptiquement le sac dans le péritoine d'un cobaye; au bout de quarante-huit heures on retire le sac de l'abdomen de l'animal (1) et son contenu est inoculé directement dans le péritoine d'un nouveau cobaye; l'exsudat péritonéal de ce second animal fournira la matière d'ensemencement d'un nouveau sac. On fait ainsi plusieurs passages successifs en alternant les ensemencements en sac avec les inoculations directes dans le péritoine. Par ces passages alternatifs le vibrion prend une telle virulence que le contenu d'un sac tue bientôt un cobaye moyen à la dose de 1/160e de centimètre cube inoculé dans la cavité péritonéale.

La conservation de la virulence s'obtient en faisant tous les trois ou quatre jours une culture en sac inclus dans le péritoine; le vibrion se trouve ainsi dans les conditions les plus favorables à son déve-

(1) Les cobayes ayant reçu dans le péritoine un sac de 2 à 4 centimètres cubes ensemencé avec un vibrion virulent succombent du troisième au cinquième jour à l'empoisonnement causé par la toxine soluble qui diffuse à travers la paroi du sac.

loppement sans être en contact direct avec les tissus du cobaye : il échappe à l'influence nuisible des phagocytes.

2° Préparer dans un matras le milieu nutritif suivant :

Eau	1000	grammes.
Peptone	20	—
Gélatine	20	—
Sel marin	10	—

Stériliser et ensemencer avec le contenu d'un sac retiré du péritoine d'un cobaye. Placer à l'étuve pendant quelques heures jusqu'à apparition d'un trouble manifeste, puis répartir purement la culture dans des boites de Petri stériles disposées dans une chambre humide à 37^c ; dès la douzième heure il existe un voile épais à la surface du liquide des boites. La culture obtient son maximum de toxicité le quatrième jour, on la filtre alors sur la bougie Chamberland. Le filtrat obtenu est alcalin et dégage une odeur spéciale; il tue le cobaye à la dose de un tiers de centimètre cube par 100 grammes du poids de l'animal. Cette toxine n'est pas sensiblement modifiée par la température de l'ébullition; elle perd son activité au contact de l'air, surtout en présence de la lumière, mais elle la conserve longtemps dans des tubes exactement remplis, scellés à la lampe et placés à l'obscurité. L'alcool absolu et le sulfate d'ammoniaque précipitent le principe actif de la toxine.

Metchnikoff a montré le rôle favorisant de certains microbes vis-à-vis des cultures du vibrion (Voy. plus haut); nous avons dit qu'une torula retirée de l'estomac de l'homme possédait à un haut degré ces propriétés favorisantes. Une culture de cette torula en bouillon ordinaire, âgée de huit jours et filtrée sur la bougie Chamberland, fournit un liquide non toxique où le vibrion cholérique produit notablement plus de toxine que dans le bouillon neuf.

Action de la toxine sur les animaux. — De tous les animaux de laboratoire le cobaye de taille moyenne ou petite est le plus sensible à la toxine cholérique ; le cobaye de forte taille résiste mieux. Le poison agit aussi sûrement et aussi rapidement quand on l'inocule sous la peau que quand on l'injecte dans le péritoine. La mort survient en six à trente-six heures avec des doses moyennes (1 centimètre cube sous la peau ou 1/3 de centimètre cube dans le péritoine pour des cobayes de 250 grammes environ); mais en injectant une grande quantité de toxine, la mort peut être produite en quelques minutes, surtout si l'on pratique l'injection dans le péritoine.

Les symptômes de l'intoxication sont analogues à ceux que produit l'inoculation des cultures vivantes, mais ils surviennent plus

rapidement : aussitôt après l'injection l'hypothermie se manifeste, elle se continue jusqu'au moment de la mort, où la température centrale est de + 24° à + 25°. A l'autopsie on constate un peu d'œdème au point d'inoculation, un peu d'épanchement péritonéal, de l'hypérémie de l'intestin grêle, de l'estomac, de la congestion des viscères abdominaux; l'intestin est distendu par un liquide diarrhéique.

Quand la quantité de toxine injectée est trop faible, il se produit une élévation passagère de la température, avant l'abaissement, et l'animal se rétablit.

Le lapin résiste mieux à la toxine que le cobaye ; à poids égal la dose mortelle pour cet animal est supérieure d'un tiers à celle qui tue le cobaye. La souris est encore plus résistante : pour tuer une souris il faut au moins 1 centimètre cube de toxine injecté sous la peau ou 1/3 de centimètre cube dans le péritoine; c'est-à-dire qu'une souris de 15 grammes résiste à la dose qui tue un cobaye de 250 grammes.

IMMUNITÉ.

I. — Ferran montre que le cobaye qui a résisté à l'inoculation sous-cutanée d'une petite dose de culture de vibrion cholérique devient réfractaire aux doses mortelles. Il tenta d'appliquer à l'homme cette méthode d'immunisation et pratiqua 50 000 vaccinations : après deux inoculations sous-cutanées de ses cultures (légère réaction fébrile) l'homme deviendrait réfractaire au choléra. Malheureusement la réalité de cette hypothèse n'a pas été démontrée.

II. — Haffkine essaye de conférer l'immunité par l'inoculation d'un virus atténué. Il prend un vibrion à virulence exaltée et fixée par une vingtaine de passages dans le péritoine de cobayes et il l'atténue en le cultivant dans du bouillon à 39° en présence d'un courant d'air ; il fait ainsi plusieurs cultures successives en réensemençant le vibrion tous les deux ou trois jours. L'injection de ces cultures atténuées confère au cobaye l'immunité contre l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale du virus exalté. Pour vacciner l'homme contre le choléra intestinal, Haffkine injecte d'abord le virus atténué et huit jours après une culture virulente. S'il est indiscutable que les vaccins d'Haffkine protègent contre la péritonite cholérique, ils semblent impuissants vis-à-vis du choléra intestinal.

III. — Pfeiffer, Klemperer, Vincenzi, Klein, etc., montrent qu'il est très aisé de protéger le cobaye contre l'infection péritonéale.

L'injection de cultures du vibrion filtrées ou stérilisées par la

chaleur empêche le développement ultérieur de la péritonite cholérique (Klemperer, Vincenzi). Klein démontre que cette vaccination peut s'obtenir par l'injection de produits de microbes différents de celui du choléra : une culture chauffée de *micrococcus prodigiosus*, injectée à petites doses, vaccine le cobaye contre des doses mortelles de vibrion. Israël voit que l'injection intra-péritonéale de bouillon neuf est susceptible de protéger les cobayes contre la péritonite vibrionienne; les injections de sérum humain (Voy. plus loin), de solution physiologique de chlorure de sodium, d'urine, agissent de même (Israël, Metchnikoff). L'injection de ces substances a pour effet d'exciter la fonction phagocytaire : les leucocytes englobent les vibrions inoculés et l'évolution de la péritonite est arrêtée.

IV. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni montrent que les animaux s'accoutument très rapidement à la toxine cholérique : les cobayes, les lapins, les chevaux, les chèvres sont susceptibles d'être immunisés par l'injection de toxine.

Les cobayes et les lapins traités par de petites doses de toxine présentent après chaque injection une hyperthermie de courte durée suivie d'une hypothermie modérée qui dure environ vingt heures; les injections répétées amènent un amaigrissement, passager chez les cobayes, plus durable chez les lapins; il est alors nécessaire d'interrompre l'immunisation jusqu'à ce que les animaux aient repris leur poids initial.

La chèvre réagit par une élévation de température à l'injection de 2 à 5 centimètres cubes de toxine; la réaction s'atténue à mesure que l'accoutumance s'établit.

Les chevaux réagissent vivement à l'injection de 10 centimètres cubes de toxine et présentent un œdème notable au point d'inoculation; on renouvelle les injections tous les dix à quinze jours et on arrive à leur faire supporter au bout de six mois des doses de 200 centimètres cubes injectées en un seul coup.

SÉROTHÉRAPIE.

I. — Klemperer montre que le sérum des animaux vaccinés contre le vibrion présente des propriétés préventives.

II. — Lazarus constate que le sang d'individus guéris du choléra possède un pouvoir préventif considérable : dans certains cas un centimètre cube du sérum extrait de ce sang suffit à protéger le cobaye contre la péritonite vibrionienne. Mais cette propriété préventive du sang ne joue aucun rôle dans la guérison du choléra humain :

Metchnikoff et Klemperer ont montré que le sérum d'hommes n'ayant jamais eu le choléra possède parfois cette propriété. De plus, Metchnikoff a trouvé que cette propriété préventive pouvait être très développée dans le sang d'individus venant de succomber au choléra et qu'elle manquait souvent chez les cholériques convalescents.

III. — Pfeiffer étudie les propriétés du sang des animaux vaccinés par injection de vibrions cholériques (Voy. plus haut). Il obtient un sérum actif au quinzième de milligramme, c'est-à-dire dont un quinzième de milligramme suffit à vacciner un cobaye contre la péritonite cholérique quand on l'injecte, avant, en même temps, ou dans les quinze minutes qui suivent l'inoculation du vibrion. Ce sérum n'est pas bactéricide, mais il possède des propriétés agglutinantes vis-à-vis du vibrion du choléra.

Pour obtenir cette agglutination on doit s'adresser à une culture sur gélose dont on délaye une petite quantité dans un peu de bouillon stérile ; on examine l'émulsion au microscope pour s'assurer qu'elle ne contient pas de grumeaux, puis on y ajoute 1/10e de sérum préventif; l'agglutination ne se produit qu'au bout de quelques instants, elle atteint son maximum quand le mélange a séjourné deux heures à l'étuve à 37°. — Ce phénomène fournit un procédé de diagnostic du vibrion : en règle, le vibrion du choléra seul est agglutiné par le sérum des animaux vaccinés contre le choléra; l'examen pratiqué comme nous venons de le dire constitue donc un bon signe d'identification du bacille virgule.

Metchnikoff a montré que le sérum de Pfeiffer ne possède pas de propriétés antitoxiques; il est extrêmement efficace contre l'envahissement du sang et des organes par le vibrion, parce qu'il excite la fonction phagocytaire et permet l'englobement du microbe par les leucocytes, mais il est totalement inefficace contre le choléra intestinal qui est une intoxication.

Pfeiffer a proposé d'utiliser la propriété immunisante du sérum des animaux vaccinés pour différencier le vibrion du choléra des espèces voisines; d'après lui le sérum d'un animal vacciné contre le choléra protège le cobaye contre l'infection par le seul vibrion cholérique et non contre les vibrions voisins; pour être fixé sur la nature d'un vibrion, il suffirait dès lors d'inoculer ce vibrion à un cobaye traité par du sérum anti-cholérique, l'animal ne résisterait qu'au cas où le vibrion inoculé appartiendrait au groupe des cholérigènes (1).

(1) Avoir soin, bien entendu, d'inoculer avec le vibrion à éprouver un cobaye témoin qui ne recevra pas de sérum.

Metchnikoff a montré que cette épreuve était absolument incertaine : la réaction d'immunité peut manquer vis-à-vis de vibrions isolés de selles cholériques et se rencontrer avec des vibrions saprophytes.

IV. — Metchnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni étudient les propriétés du sérum de leurs chevaux immunisés par la toxine (Voy. plus haut). Ce sérum est préventif contre la péritonite cholérique du cobaye, la dose préventive est comprise entre 0,01 et 0,005 centimètre cube. Il est antitoxique : deux centimètres cubes neutralisent quatre fois la dose mortelle de toxine soluble. — Injecté à la dose de 4 à 8 centimètres cubes sous la peau de petits lapins avant l'ingestion de vibrion cholérique, ce sérum s'est montré préventif contre le choléra intestinal, sur 100 lapins traités par le sérum 56 ont échappé au choléra, tandis que chez les témoins la proportion des survivants n'a été que de 16 p. 100. Le sérum s'est encore montré efficace quand il a été injecté au moment même de l'ingestion du virus, mais il a totalement échoué à guérir les animaux présentant de la diarrhée ou même ayant ingéré le vibrion depuis vingt-quatre heures.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC DU VIBRION DU CHOLÉRA.

La recherche du vibrion du choléra exige deux procédés d'investigation : l'examen microscopique et les cultures. Cette recherche elle-même est aisée, mais la détermination et l'identification du vibrion présentent au contraire de grandes difficultés. Nous nous occuperons de la recherche du vibrion dans les fèces et les eaux.

A. — EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Ce mode d'investigation ne s'applique qu'à la recherche du vibrion dans les fèces, les exsudats et les tissus des animaux.

Recherche dans les fèces. — Prendre un petit grumeau muqueux ou riziforme, l'étaler sur une lamelle et colorer le frottis par la fuchsine de Ziehl diluée. Dans les cas types cette épreuve est concluante : les vibrions existent à peu près en culture pure, ils sont groupés en bancs où les microbes sont tous orientés dans le même sens comme des poissons dans l'eau. Mais le plus souvent, au contraire, l'examen microscopique ne fournit aucune donnée concluante. En tous cas la recherche devra toujours être complétée par l'ensemencement des matières fécales.

On peut obtenir de belles préparations en pratiquant une double coloration : le frottis est d'abord soumis à la méthode de Gram, puis il est coloré par la fuchsine diluée : les vibrions du choléra sont rouges, les microbes prenant le Gram sont teintés en violet.

Coloration des coupes. — Les coupes d'intestin seront colorées par le procédé de Nicolle au tanin.

B. — CULTURES.

I. **Fèces.** — Le procédé primitivement employé consistait à pratiquer avec les matières fécales des isolements sur plaques de gélatine en boîtes de Petri suivant le procédé ordinaire, mais les plaques sont fréquemment envahies par des microbes étrangers et la recherche est interrompue. Dans tous les cas on devra donner la préférence au procédé suivant :

Procédé de choix (Metchnikoff). — 1° Préparer des tubes de solution gélo-pepto-sel de Metchnikoff (Voy. p. 30) et les ensemencer avec un peu des matières cholériques ; placer à l'étuve à + 37c.

2° Dès la troisième ou quatrième heure il se produit un trouble dans les tubes et vers la septième heure il existe un léger voile à la surface du liquide. Une trace de ce voile est examinée au microscope : d'ordinaire la culture est impure et à côté des vibrions il existe d'autres formes microbiennes.

3° Pour purifier la culture on peut pratiquer un second passage en milieu gélo-pepto-sel (ensemencer une trace du voile dans un tube neuf et reprendre la culture au bout de six à sept heures), mais il suffit d'ordinaire de pratiquer de suite un isolement sur gélose de la façon suivante :

On coule un tube de gélose liquéfiée dans une boîte de Petri, on laisse solidifier la plaque et on pratique à sa surface un isolement en stries avec une öse chargée d'une trace du voile de la culture (Voy. p. 88). La plaque est portée à l'étuve à 37c ; au bout de quelques heures apparaissent de petites colonies minces, transparentes, opalescentes, jamais opaques, que l'on peut prélever dès la sixième ou huitième heure. L'isolement est alors terminé : il n'a demandé au total qu'une quinzaine d'heures.

En même temps que l'isolement en stries sur gélose on pourra pratiquer un isolement sur plaques de gélatine : ces plaques, examinées ultérieurement, fourniront un élément de diagnostic.

II. **Eau.** — *Procédé de choix* (Metchnikoff). — 1° Préparer des fioles de Vivien de contenance de 250 centimètres cubes environ ; les jauger

à 200 centimètres et marquer sur le verre un repère avec un trait de diamant.

2° Dans chaque fiole verser la solution suivante :

Eau	50 centimètres cubes.
Peptone Chapoteau	2 grammes.
Sel marin	2 —
Gélatine	4 —
Solution de soude	Q. S. pour légère alcalinité.

Stériliser à l'autoclave.

3° Ajouter au contenu de chaque fiole 150 centimètres cubes de l'eau à examiner (jusqu'au trait de jauge de la fiole) et porter le tout à + 37°. Quand l'eau contient des vibrions, au bout de huit à dix heures il se forme un voile à la surface du liquide. On prélève une trace de ce voile, on l'examine, on fait un ou deux passages successifs dans des tubes de gélo-pepto-sel pour purifier la culture et on termine au besoin par un isolement sur gélose, comme nous l'avons dit plus haut.

IDENTIFICATION DES VIBRIONS.

Quand on a isolé un vibrion de matières fécales ou d'une eau, il faut s'assurer si ce microbe rentre bien dans la catégorie des vibrions cholériques, un certain nombre de vibrions devant être considérés comme saprophytes. Les espèces vibrioniennes rencontrées dans les eaux par Metchnikoff, Blachstein, Sanarelli, sont très nombreuses : Sanarelli en a décrit trente-deux races dans les eaux de Paris.

En réalité, il n'existe pas un seul caractère pathognomonique du vibrion du choléra, et en présence de certains vibrions rencontrés dans les eaux en dehors de toute épidémie, on peut se trouver dans l'impossibilité de poser un diagnostic. On donne d'ordinaire comme caractères classiques du vibrion du choléra :

1° L'aspect des cultures en gélatine (plaques et piqûre).

2° La présence et le nombre des cils.

3° La présence de la réaction indol-nitreuse dans les cultures en eau peptonée.

4° La non-coagulation du lait.

5° La virulence pour le cobaye.

6° L'agglutination par le sérum anti-cholérique.

7° La production de la réaction d'immunité de Pfeiffer.

Après ce que nous avons dit au cours de ce chapitre, il est inutile de revenir sur l'inconstance de ces caractères. La meilleure épreuve d'un vibrion consisterait peut-être à le faire ingérer à de jeunes lapins, seul ou associé aux microbes favorisants du choléra. Quoi

qu'il en soit, la variabilité morphologique des vibrions rend aujourd'hui leur identification fort difficile.

Nous terminerons ce chapitre en donnant brièvement les caractères de quelques vibrions voisins de celui du choléra.

Vibrion de Finkler-Prior.

Ce vibrion a été découvert par Finkler et Prior dans les selles d'un malade atteint d'entérite aiguë, il aurait été retrouvé par les mêmes auteurs dans les matières fécales de malades atteints de choléra nostras et peut-être par Ruete et Enoch dans les selles d'une femme atteinte d'une diarrhée mortelle. Le vibrion décrit par Rommelaer comme vibrion de Finkler rentre en réalité dans la catégorie des vibrions de Koch.

Inoculations. — Le vibrion de Finkler-Prior injecté dans le péritoine du cobaye détermine une péritonite vibrionienne mortelle; injecté dans le muscle pectoral il amène la mort du pigeon. Une culture sur gélose absorbée après alcalinisation de l'estomac a produit chez l'homme de légers troubles intestinaux (Metchnikoff).

Aspect microscopique. — L'aspect microscopique du vibrion de Finkler est analogue à celui du vibrion de Koch, cependant le vibrion de Finkler est légèrement renflé à sa partie moyenne et s'effile aux extrémités. Il possède les mêmes affinités pour les couleurs que le vibrion cholérique et ne prend pas le Gram. Il est mobile et possède un cil vibratile.

Caractères des cultures. — Les cultures ressemblent à celles du vibrion cholérique ; cependant la liquéfaction de la gélatine est plus rapide avec le Finkler et il ne se forme pas de bulle d'air à la surface de la cupule de liquéfaction.

Caractères biologiques. — Le vibrion de Finkler produit de l'indol, mais il ne fabrique que des traces minimes de nitrites; la réaction indol-nitreuse est positive mais très peu marquée et lente à se produire.

Vibrion de Deneke.

Ce vibrion a été isolé d'un vieux fromage par Deneke. Sa morphologie est analogue à celle du vibrion cholérique, l'aspect des colonies sur plaques de gélatine peut être identique à celui des colonies du vibrion de Koch ; il liquéfie la gélatine un peu plus vite que le vibrion de Koch, mais moins vite que celui de Finkler-Prior.

L'inoculation intrapéritonéale tue le cobaye (Hueppe, Metchnikoff). Le vibrion de Deneke est également pathogène pour le pigeon (Kasanky, Metchnikoff). L'ingestion de ce vibrion est susceptible de produire de la diarrhée chez l'homme (Metchnikoff).

Le vibrion de Deneke produit de l'indol mais très peu de nitrites, il donne irrégulièrement et très faiblement la réaction du choléra-roth.

Vibrio Metchnikowi.
Vibrion avicide.

Le vibrio Metchnikowi, découvert par Gamallia, est l'agent d'une maladie observée chez les poules à Odessa. Cette maladie se traduit par de l'abatte-

ment, de la somnolence et de la diarrhée; à l'autopsie le tube digestif est hypérémié, l'intestin grêle contient un liquide gris jaunâtre, quelquefois teinté de sang. Le vibrion se trouve en abondance dans ce liquide ; en règle, le vibrion ne passe pas dans le sang; on peut cependant le rencontrer dans le sang des jeunes poulets atteints.

Inoculations. — Le cobaye est plus sensible au vibrion avicide qu'au vibrion du choléra : il succombe aux inoculations intra-péritonéale, sous-cutanée et même à la simple ingestion sans alcalinisation préalable de l'estomac.

Le vibrion avicide tue les jeunes poulets, quel que soit le mode d'inoculation : la simple ingestion suffit à leur conférer la maladie mortelle. Les poules adultes sont beaucoup moins réceptives et résistent toujours à l'ingestion. Les pigeons, très sensibles à l'inoculation sous-cutanée ou intramusculaire, résistent à l'ingestion.

L'absorption du vibrion avicide ne produit aucun trouble morbide chez l'homme.

Aspect microscopique. — La forme du vibrion avicide est la même que celle du vibrion du choléra; parfois le vibrio Metchnikowi constitue des spirales de quatre à cinq tours; le vibrion est mobile et possède un seul cil vibratile.

Caractères des cultures. — Le vibrion avicide cultive sur tous les milieux ordinaires; les caractères des cultures sont analogues à ceux du vibrion de Koch. Sur pomme de terre la culture du vibrion avicide est plus abondante que celle du vibrion de Koch et forme une strie jaune brun. Les cultures en lait deviennent à la longue très acides et la caséine se coagule vers le huitième jour.

Caractères biologiques. — Le vibrio Metchnikowi prépare de l'indol et des nitrites dans les solutions de peptone; il donne très nettement la réaction indol-nitreuse.

CHAPITRE XXIV

LE COCCUS DE LA PELADE DE VAILLARD ET VINCENT

Vaillard et Vincent ont décrit une affection alopécique du cuir chevelu, se présentant sous la forme disséminée ou en aires, contagieuse et très fréquente dans les milieux militaires.

Cette affection, que Vaillard et Vincent désignent sous le nom de « pseudo-pelade », est due, ainsi que ces auteurs l'ont démontré, à l'invasion des follicules par un coccus.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Examen des cheveux. — Arracher au pourtour de la région alopéciée des cheveux fragiles, cédant sans résistance à une faible traction; les colorer par le violet phéniqué ou mieux par la méthode de Gram. On voit alors à la périphérie des poils, jamais dans l'épaisseur, des petits coccus groupés par deux ou en amas; quand le cheveu a entraîné avec lui quelques parcelles de la gaine épithéliale du follicule, celles-ci apparaissent « comme saupoudrées ou recouvertes en différents points de fins microcoques disposés en groupes ou en amas cohérents ». L'abondance des coccus peut être telle que ceux-ci paraissent constituer une gaine presque continue à la surface des cheveux malades.



Fig. 179. — Cheveu peladique : coccus de Vaillard et Vincent. Méthode de Gram (Reich. Obj. 9; Oc. II).

L'examen du cheveu constitue un bon procédé de diagnostic; toutefois, si les résultats de cet examen restaient négatifs, on ne serait pas autorisé à conclure à l'absence certaine du parasite dans les cheveux malades ; il faudrait alors avoir recours aux cultures.

Examen de la peau. — Exciser un fragment de peau au niveau d'une plaque alopécique ; fixer à l'alcool, inclure à la paraffine ; les coupes sont colorées par la méthode de Gram (double coloration à l'éosine et au violet. Voy. p. 224).

Sur ces coupes, les follicules sont vides de leur poil, les uns sont dilatés et encombrés de lames écailleuses d'aspect corné ; au centre de ces lamelles, on trouve parfois un vestige de poil mortifié ; les autres follicules sont rétrécis, affaissés sur eux-mêmes.

Dans tous les follicules on trouve des amas, parfois considérables, de petits coccus colorés en violet.

Jamais le parasite ne franchit la gaine épithéliale externe ; on ne le trouve que dans la partie du follicule qui se trouve en contact immédiat avec le poil.

Associations. — Parfois les follicules peladiques sont envahis par les microbes de la suppuration ; la peau de la plaque alopécique est alors rouge, enflammée, couverte de petites pustules ; la gaine externe est atteinte, dissociée, et les agents de la suppuration peuvent pénétrer dans le tissu conjonctif avoisinant les follicules.

CULTURES.

On peut obtenir de deux façons différentes des cultures du parasite de la pelade.

1° Après avoir prélevé purement un fragment de la peau alopéciée, on gratte sa surface profonde avec un bistouri flambé et on ensemence le produit du raclage sur plusieurs tubes de gélose. Ce procédé n'est guère utilisable dans la pratique journalière.

2° Le procédé de choix, pour le diagnostic de la pseudo-pelade, est le suivant :

On lave la plaque alopéciée avec de l'alcoolé de savon, puis on la rince à l'éther pour enlever toutes les matières grasses ; on la frotte ensuite avec un tampon imbibé de sublimé acide au millième ; enfin, on rince à l'alcool absolu pour enlever toute trace de sublimé ; on essuie l'excès d'alcool avec un morceau de papier filtre stérilisé.

Pratiquer alors avec un bistouri flambé quelques scarifications superficielles à la surface de la plaque alopécique ; recueillir avec l'öse de platine les gouttelettes de sang qui suintent et les ense-

mencer à la surface de trois ou quatre tubes de gélose que l'on porte à l'étuve à 37°.

Sur les tubes ainsi ensemencés, on voit apparaître, au bout de vingt-quatre heures, des colonies circulaires, blanches, saillantes, à surface lisse, brillante et régulière; ces colonies, vues par transparence, sont opaques.

Ces colonies peuvent atteindre, au bout de quelques jours, la grosseur d'une lentille.

Elles sont constituées par un petit coccus mesurant environ 1 μ de diamètre, fréquemment disposé en diplocoques, se colorant facilement par les couleurs basiques et prenant le Gram.

Le plus souvent, les colonies du microbe de Vaillard et Vincent se développent seules sur les tubes de gélose; quelquefois, elles sont mélangées à de rares colonies de staphylocoque ou de streptocoque (associations; voir plus haut).

Dans le *bouillon* à 37°, il se produit d'abord un trouble, puis, le deuxième jour, il se dépose un précipité blanchâtre, le bouillon restant trouble.

En *gélatine*, le coccus de la pseudo-pelade se développe le long de la piqûre, en produisant la liquéfaction du milieu; la liquéfaction se fait d'abord en entonnoir, puis gagne les parois du tube et envahit toute la hauteur de la gélatine.

En *strie* sur *gélose*, il forme une traînée blanche, épaisse, sans caractère spécial.

Sur *pomme de terre*, la culture est minime, d'un blanc grisâtre.

Le micrococcus de Vaillard et Vincent est aérobie; cependant, il donne des cultures grêles dans les milieux privés d'air.

INOCULATIONS.

Inoculation sous-cutanée. — *Souris.* — L'inoculation sous-cutanée d'un quart de centimètre cube de culture récente en bouillon détermine en quarante-huit heures la mort de la souris; l'animal succombe à une septicémie sans localisations apparentes; le sang et les viscères contiennent le coccus en abondance.

Cobaye et lapin. — L'inoculation sous-cutanée d'un centimètre cube de culture en bouillon ne produit aucun effet sensible.

Inoculation cutanée. — Si, après avoir coupé les poils sur une région quelconque de la peau du lapin ou du cobaye, on frictionne modérément et pendant quelques minutes cette région avec un tampon imbibé d'une culture en bouillon, on détermine en ce point la formation d'une plaque d'alopécie semblable à celles que l'on ob-

serve chez l'homme. Il n'est pas nécessaire, pour obtenir ce résultat, que l'intégrité de l'épiderme ait été altérée.

Le deuxième jour après l'inoculation, la région inoculée paraît rouge ; dès le huitième jour, les poils deviennent fragiles, s'arrachent par la moindre traction, puis ils tombent tous simultanément, spontanément, laissant une plaque glabre, blanche et lisse. Au bout de quatre semaines environ, les poils repoussent progressivement, lentement, avec leurs caractères habituels, et il ne reste plus trace de l'affection.

Si l'on pratique l'inoculation sur la face externe d'une seule oreille chez le lapin, il se développe au point frictionné une plaque alopécique, mais en outre la région homologue de l'oreille opposée perd peu à peu ses poils et devient glabre à son tour sur une étendue plus ou moins grande : c'est là une transmission par simple contact, l'animal au repos abaissant et accolant ses oreilles sur la région cervico-dorsale.

CHAPITRE XXV

LE BACILLE DE LA SÉBORRHÉE GRASSE

Des recherches récentes de Sabouraud, il résulte que la séborrhée grasse de l'homme et la pelade commune relèvent d'un même parasite. La pelade serait intimement liée à la séborrhée grasse ; toute plaque peladique est le siège d'une infection intense, pure, localisée à sa surface ; « la pelade aiguë est une séborrhée aiguë locale ; la pelade décalvante, une séborrhée chronique généralisée ».

Le bacille décrit par Sabouraud se retrouve constamment dans la séborrhée grasse et, de ce côté, les faits exposés par Sabouraud sont indiscutables ; pour ce qui est de la pelade, il semble qu'il faille faire encore des réserves et ne pas généraliser prématurément le rôle étiologique du bacille de Sabouraud ; en dehors des cas où, dans la pelade en aires, on rencontre le coccus de Vaillard et Vincent, nous avons, et encore tout récemment, observé plusieurs cas de pelades où nous n'avons pu voir ni cultiver aucun parasite spécifique. Il y a tout lieu d'admettre pour le moment que l'étiologie des pelades n'est pas univoque et que plusieurs parasites sont susceptibles de causer des lésions analogues.

RECHERCHE ET MORPHOLOGIE DU BACILLE DE LA SÉBORRHÉE GRASSE.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Pour rechercher le bacille de Sabouraud, on exprime une peau séborrhéique, puis on racle cette peau avec la tranche d'une lame porte-objet ; on obtient ainsi une exsudation huileuse dont on prépare des frottis.

Les frottis sont lavés à deux reprises différentes à l'éther pour enlever les matières grasses, puis on colore par la méthode de Gram ou plus simplement par une solution basique (bleu, thionine, violet de gentiane, fuchsine en solutions phéniquées).

Les préparations ainsi obtenues montrent, en quantité considérable et à l'état pur, un très fin bacille.

Le bacille de la séborrhée grasse est, dans ses formes jeunes, punctiforme et analogue à un coccus; les formes adultes sont plus manifestement bacillaires et mesurent environ 1 μ de longueur sur 1/2 μ de largeur; on rencontre parfois de courtes chaînettes pouvant atteindre la longueur du bacille tuberculeux.

Coloration. — Le bacille de Sabouraud se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline ; les solutions mordancées ordinairement employées sont applicables à sa coloration. Il prend le Gram.

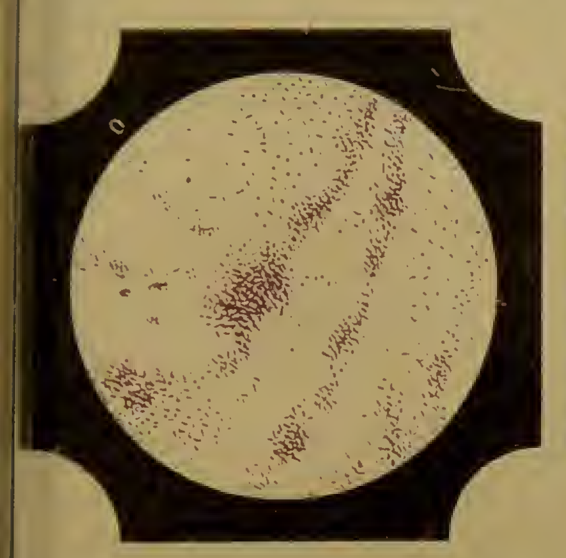


Fig. 180. — Bacille de la séborrhée grasse. Exsudat séborrhéique. Thionine phéniquée (Reich., Obj. 1/12 im. ; Oc. II).



Fig. 181. — Bacille de la séborrhée grasse (autre aspect). Exsudat séborrhéique. Thionine phéniquée (Reich. Obj. 1/12 im.; Oc. II).

Anatomie pathologique. — Les colonies microbiennes siègent dans le tiers supérieur du follicule pileux, entre la surface cutanée et l'abouchement de la glande dans le follicule; à cet endroit, le follicule présente une dilatation ampullaire ; le poil, à ce niveau, est repoussé excentriquement par un cocon de lamelles cornées et de sebum ; c'est dans ce cocon qu'est enkystée la colonie bacillaire rigoureusement pure; cette disposition se voit très bien dans les coupes verticales. Les bacilles y sont souvent sigmoïdes ou incurvés et groupés « en petites chaînettes ou en petits fagots, suivant la disposition si commune au bacille de Koch ».

Le développement du cocon séborrhéique dans l'orifice d'un follicule pileux amène la mort du cheveu, la dépilation en est la conséquence : de la séborrhée grasse du cuir chevelu dépend la calvitie séborrhéique ; les poils atteints se régénèrent et meurent successivement plusieurs fois, mais bientôt le poil finit par ne plus être représenté que par un follet microscopique. Pour ce qui est du mécanisme du phénomène, Sabouraud dit que « l'hypothèse d'un poison microbien soluble agissant sur la papille pilaire est plausible, mais plus facile à énoncer qu'à démontrer ».

Infections secondaires.

La séborrhée grasse peut garder indéfiniment son aspect caractéristique ou se compliquer d'infections secondaires. La formation des *comédons*, volumineux, caractérisant l'acné, est due à une infection secondaire : « le comédon n'est qu'un cocon séborrhéique monstrueux et dégénéré ». Au centre du comédon on retrouve toujours la colonie bacillaire, mais ses couches superficielles sont envahies par divers microbes ; de la diversité de ces espèces associées dépend le polymorphisme de l'acné. On y trouve constamment le bacille bouteille de Unna qui paraît n'avoir aucune valeur pathogène et un coccus blanc qui semble causer l'acné indurée et l'acné suppurée.

Dans certains kystes dont le contenu répand une forte odeur butyrique, Sabouraud a rencontré deux bacilles incomplètement déterminés, le coccus blanc signalé plus haut et des spirilles non cultivables.

Dans l'acné furonculeuse, l'infection secondaire est due au staphylocoque doré.

CULTURES.

Conditions de cultures et ensemencement. — Le bacille de la séborrhée exige, comme toutes les bactéries de la peau, un milieu de culture acide ; sur le milieu suivant, sa culture est « presque facile ».

Peptone	20 grammes.
Glycérine	20 —
Acide acétique cristallisable	5 gouttes.
Eau	1000 grammes.
Gélose	13 —

Cette gélose est répartie dans des tubes et solidifiée inclinée.

Pour pratiquer l'ensemencement, on lave la peau séborrhéique à l'éther, puis on la racle énergiquement avec le tranchant d'une lame de verre flambée. Le sebum obtenu est ensemencé par frottis sur la surface des tubes ; on doit ensemencer sur chaque tube une certaine quantité de sebum. Sur 3 ou 4 tubes on obtient d'emblée, au milieu de colonies étrangères, une ou deux colonies pures.

A 35°, ces colonies deviennent visibles au quatrième jour et prennent une forme conique acuminée caractéristique, en même temps qu'elles se colorent en rouge brique (uniquement sur les milieux glycérinés). Toujours on retrouve comme impuretés de très nombreuses colonies du coccus blanc signalé plus haut.

Il est très difficile d'obtenir des cultures en partant du comédon ou de la séborrhée du cuir chevelu.

La séparation du coccus blanc et du bacille présente parfois de grandes difficultés; Sabouraud conseille les procédés suivants :

1° Laisser vieillir pendant deux mois entre deux lames stériles la matière d'ensemencement : le coccus blanc meurt avant le bacille et on obtient alors assez facilement une culture pure du bacille.

On peut encore laisser vieillir une culture contenant les deux organismes; après un mois, le bacille reste seul vivant ; le réensemencement doit être pratiqué avec une parcelle notable de la culture mère.

2° Sabouraud a imaginé un procédé ingénieux qui donne rapidement des cultures pures, celui de la *gélose vaccinée*. C'est une application de ce principe que certains microbes vaccinent le milieu où on les cultive et le rendent impropre à une culture ultérieure de la même espèce.

Un bouillon préparé comme il est dit plus haut, mais sans gélose, est ensemencé avec le coccus blanc. Au bout de douze jours, on l'additionne de gélose et on en prépare des tubes stérilisés.

En ensemençant le sebum sur cette gélose vaccinée, on n'obtient pour ainsi dire plus de coccus blanc, tandis que les colonies du bacille spécifique se développent abondamment. Malheureusement, si le coccus ne se développe pas, il n'est pas tué, si bien qu'il peut réapparaître dans les cultures filles. Aussi Sabouraud préfère-t-il le procédé suivant :

3° Le sebum est soumis pendant dix heures à une température de 65°-67° ; le coccus blanc est tué, le bacille résiste et on obtient par l'ensemencement une culture pure, d'emblée.

INOCULATIONS.

Les inoculations aux animaux n'ont fourni, jusqu'à présent, aucun résultat; la peau des animaux ne se prête pas à l'expérimentation; elle ne ressemble que de très loin à la peau humaine et la flore microbienne de la peau du cobaye et du lapin est très différente de la flore microbienne de la peau de l'homme.

RECHERCHE DU BACILLE DE SABOURAUD DANS LA PELADE.

Pour Sabouraud, une plaque peladique est une manifestation aiguë de la séborrhée grasse. Si, au début d'une plaque peladique, on prélève

un morceau de la peau atteinte et que l'on y pratique des coupes verticales, on voit que tous les follicules pileux sont infectés par le bacille de la séborrhée, tandis qu'autour de la surface malade, le cuir chevelu est sain et les follicules non infectés. Comme nous l'avons dit au commencement de ce chapitre, ces faits méritent confirmation.

Plus tard, dès que le poil est tombé, la papille pilaire, avant de mourir, sécrète un bouchon informe de cellules et de pigment qui vient soulever d'une pièce et expulser du follicule le cocon microbien qui l'occupait : dès ce moment, le bacille ne se retrouve plus dans les coupes de la peau.

Pour constater la présence du bacille dans les follicules, Sabouraud recommande le procédé suivant :

Épiler la bordure d'une petite plaque malade et une assez large région autour d'elle, puis frictionner toute cette surface une ou deux fois avec de l'acide acétique pur. Une croûte se forme, et quand elle se détache de la peau, elle enlève avec elle tous les cocons séborrhéiques de la région. Les coupes verticales pratiquées dans cette croûte permettent de voir que les cocons renferment le bacille de Sabouraud à l'état pur ; on peut obtenir des cultures en ensemençant ces cocons.

CHAPITRE XXVI

LES STREPTOTHRICÉES

Les streptothricées sont des végétaux inférieurs constitués par un ›rotoplasma cellulaire ramifié ; ils se distinguent nettement des cla-lothrix, avec lesquels ils ont été longtemps confondus, en ce que es ramifications de ces derniers sont constituées par des cellules sépa-·ées, cloisonnées, disposées bout à bout en chaînettes (Metchnikoff). ›auvageot et Radais identifient le genre streptothrix au genre oospora hyphomycètes).

Les divers streptothrix ont des caractères communs ; ils se développent isément dans les milieux de culture artificiels ; dans les cultures liquides ls donnent de petits grumeaux ressemblant à des feuilles de nénuphar, le iquide n'est jamais troublé. Sur gélatine, ils forment de petites taches sphé-iques, étoilées ; sur pomme de terre ils donnent des masses sèches, dures, cailleuses, dont l'aspect et la coloration varient suivant les espèces. Dans ›s cultures âgées sur les milieux solides, on voit s'élever au-dessus de la ulture de nombreux filaments aériens portant des conidies qui donnent aissance à des spores rondes ou ovalaires, disposées en chaînettes. Pendant ı germination, l'enveloppe des spores se brise, un jeune filament sort au 'ehors et se ramifie à son tour ; les filaments peuvent se reproduire par di-ision transversale. Ainsi, selon l'âge de la culture, l'examen microscopique montre des formes ramifiées, des spores en chaînettes très analogues à es streptocoques, ou de petits filaments ressemblant fort au bacille de la uberculose aviaire : on conçoit que cette pléomorphie apparente ait pu ›endant longtemps égarer les recherches des observateurs. Nous passerons n revue les streptothrix pathogènes.

ACTINOMYCES BOVIS (Bollinger et Harz). **OOSPORA BOVIS** (Sauvageot et Radais).

Bollinger et Harz ont décrit sous le nom d'*Actinomyces bovis* le para-ite d'une maladie des bovidés connue depuis longtemps et qui se aractérise par la formation dans les os maxillaires et la langue de umeurs dures, sarcomateuses, aboutissant à la fonte purulente. Peu près, Israël et Wolff rencontraient le microbe de Bollinger dans un

pus d'empyème, chez l'homme ; depuis cette époque les observations d'actinomycose humaine se sont multipliées : on ne les compte plus aujourd'hui.

Chez l'homme on peut rencontrer, comme chez le bœuf, la tumeur du maxillaire, mais on observe aussi fréquemment des lésions locales ou une infection généralisée rappelant à s'y méprendre les affections dues au bacille de Koch ; l'actinomycose du poumon est fréquente (bronchopneumonies, pleurésies), et aussi l'actinomycose péritonéale ; le diagnostic clinique de l'actinomycose est souvent très difficile à établir et l'examen microbiologique du pus, des crachats, est appelé à rendre de grands services.

L'actinomycose a été également observée chez le porc (Duncker, Hertwig).

ACTINOMYCOSE EXPÉRIMENTALE.

Les premières inoculations d'actinomycose faites à l'aide de cultures aérobies étaient restées sans résultat, mais J. Israël et Wolff purent infecter le lapin au moyen de cultures anaérobies.

Les inoculations pratiquées avec le pus de foyers d'actinomycose humaine ont donné souvent des résultats positifs : le cobaye, le lapin, la vache ont pu être infectés (J. Israël, Ponfick, Hanau, Dor et Berard, etc.). Le lapin succombe après plusieurs mois à l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale. A l'autopsie on trouve des tumeurs actinomycosiques dans le péritoine, l'épiploon, le mésentère.

MORPHOLOGIE ET RECHERCHE DE L'ACTINOMYCES.

Aspect dans l'organisme. — Dans l'actinomycose, le pus, les crachats et les tissus envahis renferment de petits grains, jaune soufre ou rarement blanchâtres, opaques, dont les dimensions varient entre celles d'une spore de lycopode et d'un grain de millet ; c'est sur ces grains que devront porter les recherches, en ayant soin de s'adresser toujours à du pus fraîchement recueilli, le parasite se déformant rapidement. Quand les grains jaunes sont peu abondants et peu volumineux, on procédera à la recherche en étalant le pus en couche mince sur une lame porte-objet : on voit alors facilement les grains et on peut les recueillir pour l'examen.

En écrasant un grain jaune entre une lame et une lamelle dans une goutte de glycérine, on obtient une préparation extemporanée qui permet de reconnaître le parasite. Après écrasement le grain jaune se montre constitué par de petits corps mûriformes composés d'une masse centrale filamenteuse feutrée d'où partent de nombreux rayons divergents (ἀκτίς, rayon) dont la plupart sont renflés en massue à leur extrémité libre (corps jaunes).

Les filaments qui forment la masse centrale sont très enchevêtrés; ils paraissent ramifiés et sont mêlés à de petits corpuscules renflés; de place en place quelques filaments émergent et viennent se terminer à l'extérieur à côté des massues; les filaments mesurent en moyenne 10 à 12 μ de long, les massues ou crosses 20 à 30 μ de long sur 8 à 10 de large. Dans les tissus, autour du parasite s'accumulent des cellules épithélioïdes à grand noyau ovalaire; ces cellules, disposées en cercle, peuvent se fusionner pour constituer une cellule géante contenant plusieurs noyaux et le parasite lui-même; les massues ou corps jaunes ne sont autre chose que des formes de dégénérescence du parasite sous l'influence de la réaction cellulaire; ces massues n'existent pas au début du développement du parasite dans les tissus; elles apparaissent au bout d'un certain temps et seulement dans les organismes résistants; souvent même, quand la maladie marche vers la guérison, les filaments disparaissent et l'on ne trouve plus que les massues.

Coloration. — Les filaments de l'actinomycose se colorent aisément par les couleurs basiques d'aniline et prennent le Gram; les crosses se colorent par le picrocarmin, la sfaranine, l'éosine. Une préparation extemporanée colorée par le picrocarmin montre les crosses se détachant en jaune sur le fond rose des cellules.



Fig. 182. — Coupe d'un tubercule d'actinomycose. Méthode de Gram (Reich., Obj., 8, Oc. 2).

La méthode de choix pour colorer les grains consiste à les écraser sur la lame, et à les traiter, après dessiccation et fixation, par le procédé de Gram avec coloration du fond à l'éosine; les filaments sont colorés en violet, les crosses prennent une teinte jaunâtre ou rose (fig. 182). Cette méthode est applicable à la coloration des coupes; on peut aussi employer le procédé de Weiggert (Voy. p. 221).

Pour colorer le pus, quand on n'a pas trouvé à l'œil nu de granulations jaunes, Lemière et Bécue recommandent le procédé suivant: 1° étaler le pus sur la lame, dessécher et laver à l'éther; 2° faire agir quelques minutes une solution de soude à 30 p. 100; 3° colorer pendant quinze minutes dans une solution aqueuse d'éosine à 5 p. 100;

4° laver avec une solution aqueuse saturée d'acétate de soude et examiner dans cette solution. La masse centrale des amas d'actinomyces est rouge, les massues sont colorées en rose jaune pâle.

Aspect dans les cultures. — Dans les cultures, l'actinomyces revêt un aspect bien différent ; ici on trouve les filaments ramifiés, les spores, dont la plupart sont réunies en chaînettes, et les courts filaments bacillaires provenant de la germination des spores ; mais on n'observe pas les formes en crosses et en massues ; dans les vieilles cultures, cependant on peut rencontrer des formes d'involution, renflées, irrégulières, rappelant l'aspect des massues.

Cultures.

L'actinomyces est un anaérobie indifférent ; son développement commence à + 20°, mais la température eugénésique est aux environs de + 37°. La culture se ralentit à + 40°, mais se poursuivrait jusqu'aux environs de + 50°. L'actimomyces se développe sur la plupart des milieux de culture, mais de préférence sur le sérum et les milieux glycérinés.

Il est assez difficile d'obtenir une culture d'actinomyces en partant du pus ; en effet, dans le pus, l'actinomyces se trouve le plus souvent associé aux microbes ordinaires de la suppuration et ceux-ci envahissent le milieu de culture avant que le streptothrix ait pu se développer. On a indiqué plusieurs procédés pour obtenir des cultures pures ; le plus satisfaisant est celui qu'a indiqué Barstrom.

On étale le pus à grains jaunes sur des plaques de gélatine : dès le deuxième jour apparaissent des colonies autour d'un grand nombre des grains jaunes ensemencés ; ces colonies sont produites par des microbes d'impureté ; mais, à côté des grains jaunes qui ont donné lieu à une culture, on en remarque quelques-uns autour desquels la gélatine est restée stérile ; avec une öse forte, on recueille ces grains et on les transporte sur des tubes de sérum solidifié que l'on place à 37°. Au bout de cinq à six jours les cultures d'actinomyces commencent à se développer. Il est bon de pratiquer toujours un certain nombre d'ensemencements sur sérum, beaucoup de ces ensemencements étant encore envahis par des microbes étrangers.

Bouillon glycériné. — A 37°, il se développe en cinq ou six jours des petites sphères blanches, granuleuses, qui tombent au fond du vase ; le bouillon reste limpide.

Sérum. — Sur le sérum solidifié apparaissent vers le cinquième jour de petits grains blanchâtres ou jaunâtres, secs, résistants, confluant au bout de quelques jours.

Gélose glycérinée. — Dès le deuxième jour, petites colonies blanchâtres sèches, rugueuses, adhérentes à la gélose et qui confluent bientôt pour former une large bande jaunâtre, crevassée, couverte d'aspérités.

Gélatine. — Développement grêle et lent; liquéfaction minime et tardive.

Pomme de terre. — Vers le septième ou huitième jour, apparition de petites colonies incolores, quelques-unes proéminent bientôt et deviennent grisâtres, puis la culture s'épaissit et forme une membrane jaunâtre, rugueuse et mamelonnée, parfois cerclée de noir La pomme de terre brunit autour de la culture.

Lait. — Pas de coagulation.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

L'actinomyces bovis est assez résistant aux agents de destruction ; d'après Wolff, ses cultures sont tuées par une exposition de dix minutes à 70°, mais Liebmann a constaté que les spores résistent quatre-vingt-quatre minutes à l'ébullition et une heure trois quarts à une température sèche de 140°. Le sublimé à 1 p. 1000 tue les spores en cinq minutes, l'acide phénique à 5 p. 100 serait sans action, mais il suffirait d'ajouter à 10 centimètres cubes de culture en bouillon une goutte de solution de bleu de méthylène à 1 p. 100 pour la stériliser.

D'après Liebmann, l'actinomyces s'atténue en passant par le corps de l'homme et des animaux; on peut lui rendre son pouvoir végétatif et ses propriétés pathogènes en le faisant croître sur une plante : Liebmann inocule l'actinomyces dans une graine, le parasite se développe en même temps que la graine et envahit la plante qui en provient sous forme de filaments très courts capables d'infecter les tissus des animaux.

Dans l'organisme l'actinomyces est fréquemment associé à des bactéries; les associations avec les microbes de la suppuration sont les plus fréquentes; dans les lésions pulmonaires il se rencontre parfois à côté du bacille de Koch; aussi devra-t-on toujours rechercher ce dernier quand on aura décelé dans les crachats la présence de l'actinomyces.

STREPTOTHRIX MADURÆ (Vincent).
OOSPORA MADURÆ (?).

L'affection connue sous le nom de *Pied de Madura* est due à un streptothrix décrit par Vincent.

Quand on incise et exprime une des petites nodosités caractéristiques de la maladie, il s'écoule un pus sanieux contenant de petits grumeaux jaunâtres, grisâtres ou noirs, ovoïdes ou arrondis, ressemblant aux grains d'actinomycose. Leur volume est compris entre celui d'un grain de mil et celui d'une tête d'épingle; ils sont constitués par d'innombrables filaments mycéliens étroitement enchevêtrés.

MORPHOLOGIE ET RECHERCHE.

Aspect microscopique.

Les frottis obtenus avec les grumeaux sont parsemés de filaments droits ou flexueux, intriqués, très grêles, mesurant 1 μ à 1μ,5 d'épaisseur. Dans les points les moins touffus, les filaments apparaissent pourvus de ramifications; à la périphérie des bouquets mycéliens on note une disposition manifestement rayonnée; on voit fréquemment à l'extrémité ou dans la continuité des filaments de petits renflements irréguliers, mesurant 2 μ environ, mais jamais il n'existe de formes en crosses ou en massues.

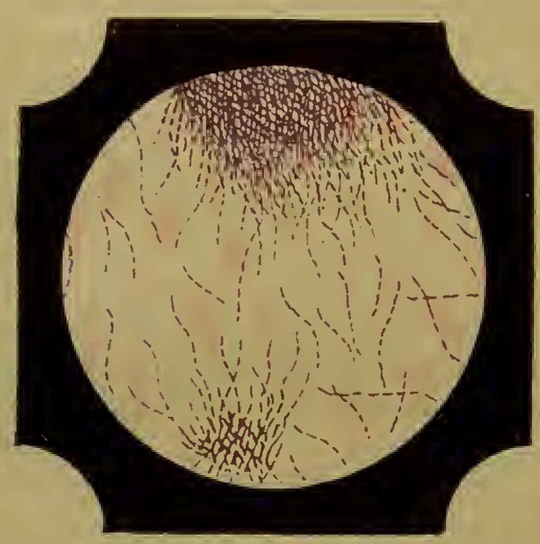


Fig. 183. — Streptothrix Maduræ (d'après Vincent).

Tous ces détails sont visibles avec un grossissement de 400 à 500 diamètres après coloration par le bleu de méthylène ou la fuchsine de Ziehl diluée.

Dans les cultures on retrouve les mêmes dispositions; cependant les filaments sont plus grêles et leur largeur n'excède pas 1 μ. Dans les cultures âgées de deux semaines, l'extrémité des filaments se fragmente souvent en une série de segments réguliers, ovoïdes, plus larges que les filaments eux-mêmes : ce sont des rameaux fructifères. Les spores ont 1,5 à 2 μ de largeur; elles sont ovoïdes, accouplées par 2 ou 3, ou en chaînettes, ou en amas volumineux; elles sont brillantes, leurs contours sont nettement accusés. Ensemencées dans du bouillon neuf elles s'allongent à une de leurs extrémités et forment un court bâtonnet à bouts arrondis.

Coloration. — Le streptothrix Maduræ fixe très facilement les

couleurs basiques d'aniline; il se colore par la méthode de Gram. L'éosine et la safranine le colorent faiblement, l'iode le teinte en jaune et l'hématoxyline en violet.

Les spores se colorent bien par les couleurs basiques et par la méthode de Gram.

Coupes. — On excise de petits fragments de peau comprenant soit des nodules encore jeunes, durs et douloureux, soit des nodules en voie de ramollissement. L'examen de ces pièces présente quelques difficultés, étant donnée la facilité avec laquelle les grains parasitaires s'énucléent des tissus. Vincent recommande le procédé suivant :

Les fragments de peau sont durcis successivement par l'alcool à 60°, 80°, 90° et 100° ; puis on pratique l'inclusion à la paraffine (Voy. p. 217). Les coupes sont collées sur la lame porte-objet (Voy. p. 220) et colorées par le carmin de Orth et la méthode de Gram.

Sur de telles coupes l'ensemble de la zone malade forme un volumineux tubercule au centre duquel se trouve le bloc mycélien présentant l'aspect que nous avons décrit plus haut.

Cultures.

Conditions de culture. — Le streptothrix Maduræ se développe de + 20° à + 40°, mais la température optima de culture est de + 37°. Il est strictement aérobie. Le développement est toujours très minime dans les milieux usuels : les infusions végétales fournissent les milieux les plus favorables.

Pour isoler le parasite à l'état de pureté, on stérilise la surface cutanée (Voy. p. 190), puis on ponctionne une nodosité avec un bistouri flambé et par l'ouverture on introduit l'extrémité d'une pipette effilée dans laquelle on aspire le contenu de la petite tumeur. On pratique l'ensemencement dans un des milieux que nous allons étudier.

Infusions végétales. — L'infusion de paille ou de foin (débarrassé des plantes aromatiques) à raison de 15 grammes par litre, fournit un excellent milieu de culture ; il en est de même d'une infusion de 20 grammes de pomme de terre pour un litre d'eau. La culture se fait de préférence dans un flacon d'Erlenmeyer où l'accès de l'air est facile.

A 37°, dès le quatrième jour apparaissent de petits flocons grisâtres dont quelques-uns se fixent à la paroi du vase, les autres tombant au fond. Au bout de vingt à trente jours ces flocons ont

acquis le volume d'un petit pois; quelques-uns d'entre eux brunissent à leur centre; d'autres, ceux qui sont restés adhérents à la paroi près de la surface du liquide, prennent une coloration rose ou rouge au bout de un à deux mois. Le liquide ne se trouble jamais; il prend à la longue une légère réaction alcaline et se fonce légèrement, souvent sa surface se couvre d'une efflorescence blanche formée par les spores.

Bouillon de viande. — La culture est très grêle; il se forme vers le quinzième ou le vingtième jour, de petits grains arrondis, grisâtres; le liquide reste clair. Au bout de plusieurs passages en bouillon, la culture devient plus abondante.

Gélatine. — Dans la gélatine ordinaire il se développe le long de la piqûre et à la surface une culture blanche très grêle. Le développement est plus abondant dans le milieu suivant :

Infusion de foin ou de pommes de terre....	100	centimètres cubes.
Gélatine	9	grammes.
Glycérine	4	—
Glycose..............................	4	—

Neutraliser et stériliser.

Le streptothrix Maduræ ne liquéfie pas la gélatine.

Gélose glycosée glycérinée. — La gélose ordinaire convient mal au streptothrix Maduræ; au contraire, sur gélose glycosée glycérinée il donne une culture abondante, constituée par des colonies saillantes, vernissées, arrondies, d'abord blanc jaunâtre et prenant ensuite une teinte rose ou même rouge vif disparaissant à la longue. Quand les colonies sont peu confluentes, elles deviennent volumineuses et s'ombiliquent, la dépression centrale reste blanche et le bourrelet devient rougeâtre.

Pomme de terre. — Vers le cinquième jour à 37° apparaissent de petites éminences blanchâtres qui prennent ensuite l'aspect de végétations mamelonnées et mûriformes. Au niveau de la culture la pomme de terre est déprimée, mais elle ne change pas de couleur. Après un mois, les colonies prennent par places une teinte rose pâle qui s'accentue de plus en plus, devient rouge vif, orangé ou rouge foncé; la coloration est d'autant plus intense que la pomme de terre est plus acide; elle peut être nulle sur certaines pommes de terre; quelques colonies paraissent saupoudrées d'une fine poussière blanchâtre constituée par des spores.

Lait. — Le streptothrix Maduræ se développe sans produire de coagulation.

Sérum, œuf. — Pas de développement.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Le streptothrix du pied de Madura est très résistant à la dessiccation : des cultures desséchées pendant neuf mois sur du papier buvard stérilisé ont donné des ensemencements fertiles; une culture sur pomme de terre âgée de vingt et un mois possédait encore sa vitalité.

Les cultures non sporulées sont tuées par une exposition de trois à cinq minutes à 60°; les spores résistent cinq minutes à 75°; elles sont tuées en trois minutes à 85°.

Associations microbiennes. — Dans les nodules suppurés, ouverts à l'extérieur, Vincent a rencontré, à côté du streptothrix, les staphylocoques blanc et doré.

INOCULATIONS.

Les tentatives d'inoculation (injections sous-cutanéé, intraveineuse et intrapéritonéale) pratiquées sur le lapin, la souris, le cobaye, le chat, le chien, le mouton et le pigeon, ont constamment échoué entre les mains de Vincent et de Nocard.

STREPTOTHRIX ASTEROÏDES (Eppinger).
OOSPORA ASTEROÏDES (Sauvageot et Radais).

Eppinger a observé un cas de méningite liée à un abcès cérébral et dans le pus de laquelle existait, en culture pure, un streptothrix. Depuis, le même auteur a retrouvé plusieurs fois ce parasite dans des affections simulant la tuberculose.

Le streptothrix d'Eppinger se présente dans le pus sous la forme de filaments ramifiés, ayant environ 0 μ, 2 de large. Dans les cultures, on trouve des formes en coccus (spores), de petits filaments bacillaires et des formes ramifiées. Dans les vieilles cultures, le contenu des filaments n'est pas homogène, il y existe des vacuoles séparant des granulations cubiques ou arrondies. Au début du développement, les filaments sont fréquemment disposés en étoiles.

Le microbe d'Eppinger se colore par les couleurs basiques et prend le Gram.

Le milieu de culture le plus favorable est la gélose glycosée à 2 p. 100; les colonies y forment des verrues blanchâtres prenant à la longue une teinte rouge ocreuse en même temps que leur surface se ride et se plisse.

Le streptothrix asteroïdes se développe sur la gélatine sans la liquéfier.

Il est très pathogène pour le lapin et le cobaye; les animaux succombent à une affection pseudo-tuberculeuse ; dans les tubercules le parasite abonde.

MICROMYCES HOFFMANNI (Max Grüber). OOSPORA HOFFMANNI. (?)

Almquist et Max Grüber ont décrit deux streptothrix pathogènes. Le premier a été découvert par Almquist dans le pus d'une méningite et est peut-être analogue à l'oospora asteroïdes. Max Grüber a décrit le micromyces Hoffmanni qui se rapproche beaucoup de l'actinomyces bovis, mais dont l'inoculation produit chez le lapin des abcès locaux guérissant spontanément.

STREPTOTHRIX DU FARCIN DU BOEUF (Nocard). OOSPORA FARCINICA (Sauvageot et Radais).

Le parasite du farcin du bœuf, décrit par Nocard, n'est pas pathogène pour l'homme ; nous ne pouvons nous dispenser d'en dire quelques mots, car il constitue une des espèces les mieux connues parmi les streptothricées.

Le farcin du bœuf, qu'il ne faut pas confondre avec le farcin de l'homme et du cheval produit par le bacille de Schütz-Löffler, n'atteint que les bovidés ; il est caractérisé par la formation d'adénites et de lymphangites superficielles, puis par des lésions tardives des poumons et des viscères.

INOCULATIONS.

Le streptothrix du farcin du bœuf est inoculable au bœuf, au mouton et au cobaye. Le cobaye est l'animal de choix pour les inoculations expérimentales. Le lapin, les équidés, le chien sont réfractaires.

L'inoculation sous-cutanée provoque, chez le cobaye, la formation d'un vaste abcès compliqué de lymphangite ; l'abcès s'ouvre au dehors et l'animal guérit.

L'inoculation intrapéritonéale provoque au bout de deux à trois semaines le développement d'une péritonite d'apparence tuberculeuse ; l'épiploon, la surface des viscères abdominaux sont couverts de tubercules.

L'injection intraveineuse tue rapidement le cobaye en produisant une véritable tuberculose miliaire généralisée ; tous les viscères sont infiltrés par les tubercules.

RECHERCHE ET ASPECT MICROSCOPIQUE.

Le streptothrix du farcin se présente sous la forme de fins filaments enchevêtrés en pelotons de la périphérie desquels partent de nombreux prolongements rappelant l'aspect d'une semence de bardane.

Les filaments ne présentent qu'un petit nombre de ramifications ; on ne trouve jamais de formes en massues.

Dans les cultures on rencontre de nombreuses spores ovoïdes, très petites, non colorables par les procédés ordinaires.

Coloration. — Le streptothrix de Nocard fixe les couleurs basiques et prend le Gram.

Recherche. — On recherche le parasite dans les lamelles préparées avec le pus et colorées par la méthode de Gram et l'éosine.

Les coupes des lésions tuberculeuses, effectuées sur des fragments durcis à l'alcool et inclus à la paraffine, sont colorées par la méthode de Gram avec fond à l'éosine ou au picrocarmin de Orth ; au centre des tubercules se rencontrent les pelotons de filaments.

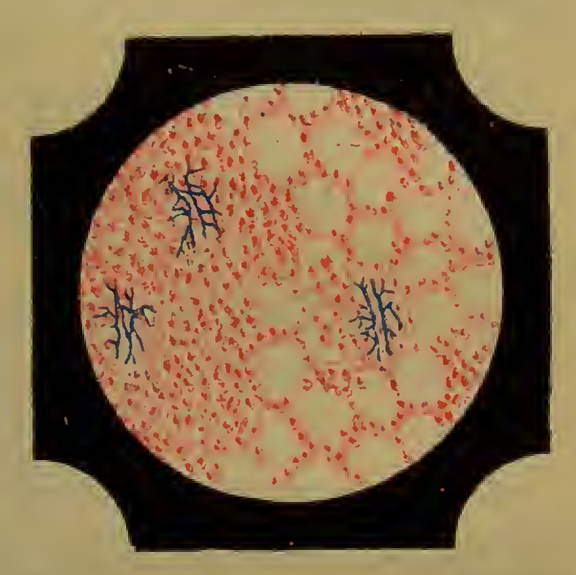


Fig. 184. — Farcin du bœuf. Poumon de mouton. Méthode de Gram (Reich. Obj. 9 ; Oc. II).

CULTURES.

Conditions de culture. — Le streptothrix farcinica est strictement aérobie; il cultive entre + 30c et + 40c sur les milieux ordinaires. Il est aisé d'en obtenir des cultures pures en opérant le prélèvement avec une pipette Pasteur au centre d'un abcès non ouvert à l'extérieur.

Bouillon. — Flocons blanchâtres, irréguliers, dont quelques-uns flottent à la surface en formant une pellicule grisâtre, poussiéreuse, les autres tombant au fond du vase. Le liquide reste clair.

Bouillon glycériné. — Développement analogue mais plus abondant.

Gélose. — Il se développe de petites colonies arrondies, saillantes, opaques, blanc jaunâtre, qui confluent pour former une culture mamelonnée, plissée, terne et poussiéreuse.

Sérum. — Mêmes caractères que sur gélose, mais culture moins abondante.

Pomme de terre. — Culture abondante constituée par des plaques très saillantes, sèches, rugueuses, jaunâtres, à bords taillés à pic.

Lait. — Développement sous forme de petits grains grisâtres, sans coagulation du liquide.

CHAPITRE XXVII

LES LEVURES PATHOGÈNES

SACCHAROMYCES ALBICANS (Audry).

OÏDIUM ALBICANS (Robin), **SYRINGOSPORA ROBINII** (Quinquaud).

Ch. Robin a découvert et décrit le parasite du muguet sous le nom d'oïdium albicans; les recherches d'Audry ont établi que ce microorganisme est une levure, un saccharomyces.

RECHERCHE ET ASPECT MICROSCOPIQUE.

Il est aisé de voir le parasite dans les concrétions blanchâtres caractéristiques de la stomatite crémeuse. On prélève un petit fragment de la concrétion, on le dissocie dans une goutte d'eau sur le porte-objet, on fait agir pendant quelques instants la liqueur de Gram forte (p. 213) et on couvre d'une lamelle. Le parasite se colore en brun par l'iode. — On peut encore dissocier le fragment dans une goutte de glycérine, ou mieux d'acide acétique qui pâlit les cellules épithéliales et rend le parasite plus visible. — Enfin, des frottis desséchés peuvent être traités par une solution aqueuse d'une couleur basique d'aniline; ces couleurs se fixent sur le protoplasma des cellules parasitaires.

Les plaques blanchâtres du muguet sont constituées par le parasite et des cellules épithéliales pavimenteuses. Le parasite se présente sous l'aspect de longs filaments enchevêtrés et entremêlés de corpuscules ovoïdes ou arrondis très abondants (mycélium et spores des anciens auteurs).

CULTURES.

Conditions de culture. — Le parasite se développe entre + 20° et + 39° sur la plupart des milieux de culture. Il est exclusivement aérobie ; il se développe aussi facilement en milieu acide qu'en milieu

neutre ou légèrement alcalin. En prélevant une parcelle de la concrétion et en l'étalant sur des plaques de gélatine après l'avoir comprimée entre deux doubles de papier filtre stérilisé, on obtient facilement des colonies de saccharomyces albicans ; mieux vaut encore délayer le fragment de concrétion dans un peu d'eau stérile et faire un isolement sur gélatine avec une goutte de cette eau.

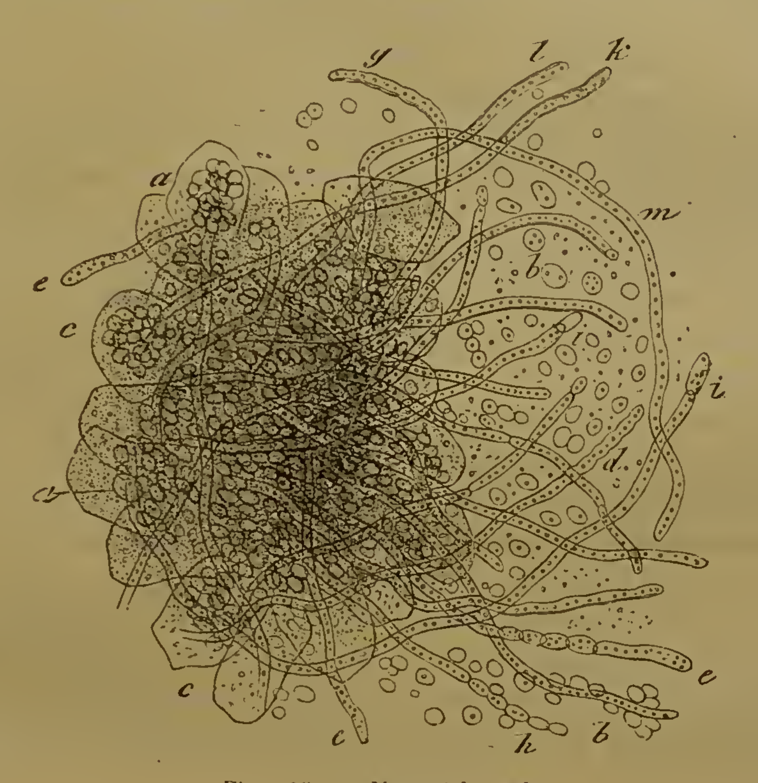


Fig. 185. — Muguet buccal.

Gélatine. — Sur gélatine les colonies du saccharomyces albicans ont un aspect fort caractéristique ; rapidement il se forme de petites taches sphériques ayant l'apparence de petites perles très blanches ; les colonies ne prennent jamais de grandes dimensions, la gélatine n'est pas liquéfiée.

Gélose. — A 37°, le développement est très rapide, les colonies sont étalées, lisses et blanches.

Pomme de terre. — Petites colonies saillantes, blanc sale, parfois tachetées de noir.

Carotte. — Sur des tranches de carotte stérilisées à l'autoclave dans des tubes de Roux, le saccharomyces albicans donne en quarante-huit heures une culture abondante d'un blanc éclatant.

Bouillon, vin stérilisé, liquide de Nœgeli. — Petits grumeaux blancs, le liquide restant clair.

Salive. — Le saccharomyces albicans ne peut être cultivé dans la

salive (Roux et Linossier); ce fait explique pourquoi le muguet se développe de préférence dans les deux premiers mois de la vie, alors que la sécrétion salivaire n'a pas commencé, ou au cours des maladies qui entraînent une diminution de la sécrétion de la salive.

Aspect dans les cultures. — L'aspect du saccharomyces albicans diffère totalement suivant la nature du milieu où s'est fait le développement. Dans les cultures en bouillon, il existe des formes analogues à celles que nous avons décrites dans les concrétions blanches du muguet : longs filaments enchevêtrés, entremêlés de nombreuses cellules ovalaires. — Dans le vin, on ne voit que des filaments sans cellules ovalaires. Dans les cultures sur milieux solides, on obtient un aspect nouveau : on n'observe que des cellules ovalaires ou rondes, irrégulières, isolées ou réunies en groupements irréguliers, entourées d'une membrane réfringente qui ne fixe pas les couleurs basiques; quelques-unes de ces cellules sont en voie de bourgeonnement. Dans la liquide de Nœgeli, le développement revêt des caractères particuliers; nous assistons à la formation des spores (que l'on n'observe jamais dans les autres milieux de cultures); à l'examen microscopique, on voit des chapelets de cellules ovalaires à l'extrémité desquels apparaissent des formes sphériques volumineuses, les *clamydospores*. A l'intérieur de ces sphères se forment les spores qui sont mises en liberté par déhiscence. Quand on veut étudier les clamydospores, il ne faut pas transporter le saccharomyces dans une goutte d'eau, ce liquide déterminant l'éclatement des clamydospores et la mise en liberté des spores. L'examen doit être pratiqué dans une goutte du liquide qui a servi à la culture ou de glycérine.

INOCULATIONS.

Klemperer, Roux et Linossier ont montré que l'injection d'une culture pure dans la veine auriculaire du lapin détermine une mycose généralisée aboutissant à la mort.

Chez l'homme, d'ailleurs, le saccharomyces albicans est susceptible, dans certaines conditions exceptionnelles, de passer dans le sang et d'entraîner une infection généralisée (Wirchow, Wagner, Schworb).

SACCHAROMYCES SUBCUTANEUS TUMEFACIENS (Curtis).

Curtis a observé chez l'homme une tumeur myxomateuse de la cuisse causée par un parasite qu'il a nommé *saccharomyces subcutaneus tumefaciens*.

Le parasite décrit par Curtis se présente sous deux formes distinctes : la *forme nue* et la *forme encapsulée*, selon qu'on l'observe dans les cultures

ou les tissus vivants. La forme encapsulée peut cependant se rencontrer dans les cultures.

a. Après quarante-huit heures à 37°, les cultures sur gélose sont constituées par de petites cellules rondes ou ovoïdes de 3 à 6 μ de diamètre, entourées d'une membrane à doubles contours et contenant un ou deux petits grains très réfringents ; dans les cultures jeunes, les cellules ovoïdes sont plus nombreuses que les cellules sphériques et presque toutes portent à une de leurs extrémités un petit bourgeon ; le violet de méthyle 6B teinte en violet foncé le centre de ces cellules et en violet rouge leur paroi ; les petits grains réfringents restent incolores. La levure prend le Gram.

b. Dans les tissus de l'homme et des animaux, le parasite devient beaucoup plus volumineux : on trouve de grosses sphères de 16 à 20 μ de diamètre, pourvues d'une paroi propre d'environ 0 μ, 5 d'épaisseur et entourées d'une capsule hyaline de 8 à 10 μ d'épaisseur. On rencontre également des formes ovoïdes et des cellules en voie de bourgeonnement ; le bourgeon naissant et la cellule mère sont alors contenus dans la même capsule, les jeunes bourgeons sont remplis de grains de chromatine.

Coupes. — Curtis recommande la méthode suivante pour la coloration des coupes :

1° Colorer pendant quelques minutes dans le carmin de Orth.

2° Faire agir pendant dix minutes la solution suivante :

Solution saturée de violet de méthyle 6B dans l'alcool absolu	1 centimètre cube.
Solution aqueuse de potasse caustique à 1/10000..	9 centimètres cubes.

3° Décolorer pendant une minute avec la solution suivante :

Acide pyrogallique	1 gramme.
Eau distillée	100 centimètres cubes.

4° Déshydrater et monter dans le baume.

CULTURES.

Le saccharomyces tumefaciens est aérobie ; il se développe à la température ordinaire et mieux à l'étuve à 37°, sur les milieux neutres ou légèrement acides.

Gélose. — Au bout de quarante-huit à soixante-douze heures, quand la semence provient d'un animal vivant, apparaissent des colonies punctiformes, blanches et opaques, se fusionnant à la longue, mais ne formant jamais une strie uniforme. Après plusieurs passages sur gélose, la culture est plus rapide et plus abondante ; on obtient une strie brillante, épaisse et crémeuse, réensemençable même après six mois.

Gélatine. — Le long de la piqûre, petite traînée blanche, discontinue, composée de colonies punctiformes, plus abondantes à la surface qu'à la partie inférieure du tube. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Bouillon. — Culture minime constituée par de petits flocons blanchâtres tombant au fond du tube, le liquide reste clair.

Touraillon et moût de bière. — Donnent des cultures plus abondantes que le bouillon ; le développement est très luxuriant ainsi que dans tous les milieux possédant une acidité légère correspondant à 0,3 ou 0,5 d'acide sulfurique par litre.

Pomme de terre. — A 37°, en quarante-huit heures, il se développe une strie blanche et sèche qui brunit à la longue.

Pomme de terre glycérinée. — Enduit blanc et crémeux finissant par couvrir toute la surface de la pomme de terre.

Sérum. — Pas de développement.

INOCULATIONS.

Le cobaye est absolument réfractaire. Le lapin, à la suite de l'inoculation sous-cutanée, présente un petit abcès local et guérit ; l'inoculation intraveineuse ne produit aucun trouble chez cet animal.

Le rat, la souris et le chien sont réceptifs.

Le rat et la souris, à la suite de l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité de culture, présentent une tumeur analogue à celle de l'homme et qui peut prendre un développement énorme ; l'animal peut succomber au bout d'un temps fort long, mais le sang n'est jamais envahi. Parfois des formations néoplasiques envahissent tous les viscères sous la forme d'un semis de petits points blancs. Dans les tumeurs, on retrouve toujours le saccharomyces en culture pure.

ESPÈCES NON DÉFINIES.

Achalme et Troisier (angine chez l'homme), Bum (abcès humain), San Felice, Maffucci et Sirleo, Lydia Rubinowitch, etc., ont rencontré des levures pathogènes.

Une levure rencontrée par San Felice dans le jus de fruits fermentés tuait le cobaye en trente jours avec formation d'une tumeur molle au lieu d'inoculation (*saccharomyces neoformans*).

Le même auteur a trouvé dans le ganglion d'un bœuf atteint d'une affection carcinomateuse du foie une levure pathogène pour le cobaye chez lequel elle produit des tumeurs contenant des concrétions calcaires (*saccharomyces litogenes*).

CHAPITRE XXVIII

LES MOISISSURES PATHOGÈNES

ASPERGILLUS FUMIGATUS.

Laulanié a montré que l'*aspergillus fumigatus* était susceptible de produire chez l'animal des pseudo-tuberculoses expérimentales, et Dieulafoy, Chantemesse et Widal, Potain, R. Boyce, Gaucher et Sergent, Rénon, etc., ont observé des cas de pseudo-tuberculose aspergillaire chez l'homme.

La tuberculose aspergillaire de l'homme sévit uniquement chez les gaveurs de pigeons ; les pigeons présentent fréquemment sur la muqueuse buccale un *chancre* produit par l'aspergillus, et Rénon a montré qu'en ensemençant sur des milieux appropriés des graines de millet et de vesce on obtient des cultures de diverses espèces d'aspergillus et en particulier d'aspergillus fumigatus.

Dans les lésions de l'homme l'aspergillus est fréquemment associé au bacille de Koch.

RECHERCHE.

On recherche l'*aspergillus* dans les crachats par l'examen microscopique et les cultures.

Examen microscopique. — Rénon recommande le procédé suivant : préparer des frottis avec les parties vertes des crachats et colorer en faisant agir pendant dix minutes une solution aqueuse de safranine ; le mycélium et les spores sont teintés en orangé clair.

Ensemencement. — Prélever purement de petites parcelles au centre des crachats verdâtres et ensemencer ces parcelles dans des tubes contenant du liquide de Raulin.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'*aspergillus fumigatus* est constitué par un mycélium filamenteux d'où partent à angle droit des prolongements renflés en massues et

portant les spores; ces spores sont arrondies, brunâtres ou verdâtres; leur diamètre atteint 3 à 4 μ.

L'aspergillus se colore bien par les couleurs d'aniline et prend le Gram.

CULTURES.

L'*Aspergillus fumigatus* se développe de préférence dans le liquide de Raulin ou le moût de bière ; exclusivement aérobie, il cultive à partir de + 22°.

Bouillon. — Culture très grêle apparaissant tardivement; flocons mycéliens dans le liquide clair; la sporulation est très rare en bouillon.

Liquide de Raulin. — Développement abondant; nombreux flocons dès la quinzième heure à 37°. Dans la culture, filaments enchevêtrés et très nombreuses fructifications.

Gélatine. — Développement tardif de très minimes flocons le long de la strie; les spores n'apparaissent en très petit nombre que vers la quatrième semaine; à la longue il se produit une très légère liquéfaction.

Gélose. — Vers le deuxième jour à 37°, il se produit un enduit blanc le long de la strie; peu à peu la culture prend une teinte verte qui se fonce progressivement.

Pomme de terre. — Strie abondante se développant rapidement et devenant vert noir.

INOCULATIONS.

Le pigeon, le lapin et le singe sont réceptifs; le chien et le chat semblent réfractaires.

Le pigeon constitue l'animal de choix pour les inoculations. Les passages par le pigeon exaltent la virulence du parasite (Kotliar).

L'injection dans la veine axillaire du pigeon d'une culture en milieu de Raulin entraîne la mort de l'animal plus ou moins rapidement suivant la dose injectée : une dose de 2 à 3 centimètres tue en quarante-huit à soixante-douze heures, une dose de 1 centimètre entraîne une maladie à marche lente se terminant par la mort au bout d'une quinzaine de jours.

Quand la mort survient de bonne heure les lésions macroscopiques sont peu accusées, on ne trouve des tubercules que dans le foie ; les poumons et la rate paraissent simplement hypérémiés. Quand la maladie a une marche lente on voit à l'œil nu de nombreux tubercules dans les viscères et notamment dans le foie; ces lésions peuvent présenter tous les stades de l'évolution tuberculeuse typique (granu-

lations miliaires, dégénérescence caséeuse, transformation fibreuse).

L'examen microscopique des organes permet de constater les lésions classiques de la tuberculose de Koch, mais dans tous les tubercules on trouve un feutrage épais de mycélium et de spores.

Coloration des coupes. — Les coupes pratiquées après durcissement à l'alcool et inclusion à la paraffine seront colorées par la méthode de Gram ou par le procédé de Weigert modifié ainsi qu'il suit :

1° Coloration au picrocarmin de Orth (p. 224).

2° Séjour de vingt minutes dans le violet de gentiane aniliné ou phéniqué.

3° Lavage rapide dans une solution de sel marin à 0,7 p. 100 ; enlever l'excès de liquide avec un morceau de papier filtre.

4° Faire agir pendant une minute le liquide de Gram, puis enlever le liquide avec du papier filtre.

5° Déposer sur la coupe quelques gouttes d'huile d'aniline ; laisser agir quelques instants.

6° Remplacer l'huile par du xylol ; absorber l'excès de liquide et monter dans le baume.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Kotliar a montré que dans les milieux de culture (bouillon, liquide de Raulin), l'*Aspergillus fumigatus* ne formait pas de toxines ni de substances vaccinantes.

ACHORION SCHŒNLEINII.

Schönlein a montré que le *favus* est causé par un champignon, l'*achorion* :

L'achorion Schönleinii peut envahir tous les éléments épithéliaux; on le rencontre dans le cuir chevelu (godet favique), la peau (favus des parties glabres), les ongles (ongles en moelle de jonc); dans une observation de Kaposi et Kundrat le parasite avait envahi la muqueuse de l'œsophage, de l'estomac et de l'intestin.

Le cheveu favique émerge le plus souvent d'un *godet*, il est décoloré jusqu'à une faible distance de son émergence; il s'épile en entier et ne casse pas sous la pince.

RECHERCHE.

On place sur une lamelle une goutte de solution de potasse caustique à 40 p. 100, on y dépose le cheveu et on recouvre avec une lamelle. On chauffe avec précaution sur la veilleuse d'un bec Bunsen

jusqu'à production de l'ébullition. Dès qu'une bulle s'est formée on arrête la dissociation en posant la lame sur un corps froid et on examine immédiatement (oc. 1, obj. 8) ; le cheveu est éclairci et laisse voir le parasite. Ces préparations sont très favorables à l'étude, mais elles ne se conservent pas. On obtient des préparations durables en faisant pénétrer, par capillarité, sous la lamelle des préparations à la potasse, une gouttelette de glycérine éosinée. Il ne faut jamais faire agir l'eau sur les cheveux traités par la potasse : ils se réduiraient immédiatement en une fine poussière.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

Dans les cheveux faviques traités par la potasse on aperçoit de nombreux filaments mycéliens sporulés ou non. Ces filaments sont placés suivant l'axe du cheveu, ils sont ténus, noueux, simples ou pourvus de 2 à 4 ramifications. Les spores ont 3 à 7 μ de diamètre, elles sont arrondies ou légèrement aplaties par pression réciproque; elles n'infiltrent pas la totalité du poil, mais y forment des chaînes ramifiées séparées les unes des autres.

Le parasite franchit les gaines épithéliales et pénètre dans le derme; il détruit la papille pilaire et entraîne la chute du poil. Au niveau des godets faviques il se produit une surproduction de cellules épithéliales au milieu desquelles on trouve le parasite agglutiné par une glaire amorphe.

Dans le poil le parasite se caractérise par les particularités suivantes :

a). Il ne possède pas d'enveloppe visible; en réalité, il existe bien une enveloppe, mais elle est très réfringente et difficile à déceler.

b). Le mycélium a un aspect irrégulier, noueux, les filaments sont sinueux.

c). Le parasite n'infiltre jamais la totalité du poil.

d). Les filaments se divisent en 3 ou 4 ramifications rappelant l'aspect des os du tarse de l'homme (tarse favique).

L'achorion se distingue des autres moisissures en ce qu'il ne cultive pas sur les milieux acides (Duclaux et Verujski) : une acidité supérieure à 0 gr. 3 d'acide tartrique par litre arrête la culture. Il exige pour se développer des milieux riches en peptone; les sucres lui conviennent fort mal, au contraire la glycérine et la mannite sont pour lui des aliments de choix. Il est aérobie.

Son développement commence à + 15°; la température optima est de + 33°; à + 38° le développement s'arrête.

CULTURES.

L'Achorion Schönleinii n'existe pas à l'état pur dans les lésions faviques ; pour obtenir des cultures pures il faut avoir recours à des procédés spéciaux d'isolement.

Dans une cellule dépolie et stérilisée on triture un fragment de godet favique avec un peu d'acide silicique pulvérulent et stérilisé ; on dissémine la poussière obtenue sur une plaque de gélatine en boîte de Petri ; on prélève les colonies qui se développent au niveau des points où a été déposée une seule spore.

Le bouillon et la gélose glycérinés constituent d'excellents milieux de culture.

L'aspect de la culture est très caractéristique : sur la gélose il se forme un enduit jaune brunâtre, plissé, irrégulier, déprimé au centre et rappelant l'aspect des godets faviques observés sur la peau. A la surface du bouillon on voit se produire une grosse colonie très étalée qui flotte et prend l'aspect de la culture sur gélose.

INOCULATIONS.

Les inoculations n'ont fourni que des résultats incertains.

Favus des animaux.

Sabrazès a décrit le favus du chien et de la poule, Bodin celui de la souris; les parasites de ces affections sont voisins de l'Achorion Schönleinii mais ne lui sont pas identifiques.

TRICOPHYTON TONSURANS.

Le Tricophyton a été découvert par Gruby et décrit par Maimsten sous le nom qu'il porte encore aujourd'hui.

Le tricophyton produit des hyphes sporifères disposées en grappe et rentre par conséquent dans le groupe des Bothrytis. Il se développe sur le cuir chevelu (teigne tonsurante), sur la barbe (sycosis), sur la peau glabre (herpès circiné, folliculite agminée) et dans les ongles.

Comme l'achorion le tricophyton ne pousse pas sur les milieux acides; il se développe de préférence dans les milieux contenant du sucre et peu de matières azotées, en particulier dans le moût de bière (180 p. 1000 de maltose) et dans le liquide suivant (Sabouraud) :

Maltose	3,80.
Peptone	0,75
Eau	100 grammes.

Ce liquide peut être solidifié par addition de 14 p. 1000 de gélose.

Pour obtenir des cultures de tricophyton, on peut s'adresser à un poil malade, au contenu d'une vésicule d'herpès circiné ou à du sang recueilli au niveau des lésions.

1° *Ensemencement du sang.* — Prélever quelques gouttes de sang au niveau des parties malades en opérant comme nous l'avons dit à propos de la pelade et étaler ce sang sur des tubes de gélose de Sabouraud inclinée.

2° *Ensemencement du contenu des vésicules.* — Prélever purement avec une très fine pipette ou une öse le contenu d'une vésicule et l'étaler sur des tubes de gélose de Sabouraud.

3° *Ensemencement d'un cheveu.* — Le tricophyton est mélangé dans les lésions à cinq ou six espèces commensales; pour pratiquer l'isolement Sabouraud conseille le procédé suivant :

On arrache un cheveu malade et on le dépose sur une lame flambée; avec une aiguille coupante on le sectionne en autant de fragments qu'il est possible. Chaque fragment est transporté sur un milieu nutritif (moût de bière ou liquide de Sabouraud) contenant beaucoup de sucre et peu de peptone, milieu sur lequel les espèces commensales ne se développent pas. On fait deux à trois passages à + 18° sur le même milieu, puis on peut prélever un fragment de la dernière culture, âgée d'environ 20 jours, et en faire un frottis sur une tranche de pomme de terre; on obtient aisément ainsi des colonies isolées de tricophyton.

Sabouraud désigne le tricophyton tonsurans de Malmsten sous le nom de tricophyton macrosporum, pour écarter toute confusion avec un autre champignon à petites spores, le microsporum Audouini, qui cause lui aussi une teigne et que nous étudierons plus loin.

Dans l'espèce *tricophyton macrosporum* Sabouraud distingue deux variétés :

A. — TRICOPHYTON ENDOTHRIX.

Le tricophyton endothrix se développe à l'intérieur du cheveu. Le cheveu atteint est cassé très court, il est plus gros que les cheveux sains et ne présente pas de collerette; il est très difficile à épiler; parfois il est décoloré.

ASPECT MICROSCOPIQUE.

L'examen microscopique, pratiqué sur un cheveu traité par la potasse (Voy. plus haut) ou dissocié dans une goutte d'acide acétique et monté dans la glycérine, montre que ce cheveu est rempli de spores

très nombreuses, disposées en chaînettes, et de filaments mycéliens peu abondants. Le parasite se reconnaît aux caractères suivants :

a). Les spores ont 5 à 6 μ de diamètre; elles sont rondes ou cubiques à angles émoussés et forment des chapelets.

b). La totalité du cheveu est envahie par les spores.

c). Les filaments mycéliens présentent au plus deux bifurcations, jamais il n'existe l'aspect du tarse favique.

Certains tricophytons se laissent facilement dissocier; d'autres au contraire résistent à l'action de la potasse.



Fig. 186. — Tricophyton macrosporum. — Cheveu (Reich. Obj. 8; Oc. II).

CULTURES.

Le tricophyton endothrix forme à la surface des milieux de culture un tapis feutré, continu, de couleur crème, avec des nervures rayonnant du centre à la périphérie. Parfois le centre de la culture se creuse en un godet entouré d'une zone poudreuse.

Dans les cultures on obtient un mycélium avec hyphes sporifères en grappes; dans les milieux peptonisés ordinaires le développement est peu intense et l'on obtient l'aspect observé chez l'homme.

INOCULATIONS.

L'inoculation est difficile à réussir chez l'homme à cause de l'acidité des sécrétions cutanées, acidité qui s'oppose au développement du parasite. Pour réussir l'inoculation il faut rendre la sueur alcaline en administrant au patient quinze à vingt grammes de bicarbonate de soude ; on peut encore brûler un point de la peau en y appliquant la pointe rouge d'une allumette qui vient de s'éteindre : il se forme une petite vésicule contenant un liquide neutre; le lendemain on inocule le parasite à l'intérieur de la vésicule.

L'inoculation du tricophyton endothrix réussit très difficilement chez les animaux (cobaye, lapin, chat). La lésion guérit spontanément en cinq à six semaines.

B. — TRICOPHYTON ECTOTHRIX.

Le tricophyton ectothrix est d'origine animale (cheval) ; il produit chez l'enfant la teigne dite *Kérion de Celse* et chez l'adulte le *sycosis* et la *tricophytie unguéale*.

Le tricophyton ectothrix est pyogène ; les lésions qu'il provoque s'accompagnent de dermite.

Le cheveu atteint est cassé et légèrement replié sur lui-même à son extrémité libre, ce qui donne à la plaque de teigne un aspect irrégulier caractéristique.

Le parasite se développe au dehors du cheveu et forme une collerette autour de la portion radiculaire de celui-ci ; le tricophyton ectothrix végète surtout au dehors du cheveu, la gaine épidermique est pénétrée plus que le cheveu lui-même.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Il ne faut jamais rechercher le parasite dans un poil adulte ; on s'adressera de préférence aux petits poils follets qu'on rencontre à la périphérie des lésions. Le poil follet enlevé avec le cône épidermique dont il émerge est examiné après action de la potasse ; les filaments sporulés forment une masse compacte dans la gaine épidermique du poil. Les spores sont en général plus grosses que dans le T. m. endothrix et on en rencontre parfois quelques-unes énormes atteignant 15 à 18 μ de diamètre.

Quand on échoue à rencontrer le parasite sur les poils, on prend le pus d'une vésicule non encore ouverte et on en examine une gouttelette sans coloration. Dans ce pus on observe un petit nombre de filaments sporulés présentant les mêmes caractères que ceux des poils ; en éclairant fortement avec le condensateur Abbé, on voit entre les globules de pus une quantité de débris mycéliens très grêles et très courts qui avaient passé inaperçus à l'examen à la lumière ordinaire. Il est difficile d'obtenir des préparations colorées satisfaisantes ; la fuschine et l'éosine donnent les meilleurs résultats.

CULTURES.

Sur le moût de bière gélosé, milieu de choix, la culture forme d'abord une fine houppe duveteuse, blanche, qui s'accroît et s'entoure de rayons étoilés ; puis, vers le huitième jour elle se couvre d'une poussière blanche, plâtreuse ; vers le quinzième jour, reparaît au centre une houppe de duvet.

Toujours les cultures sont blanches; ce caractère est important, les tricophytons à cultures blanches étant tous pyogènes. Le tricophyton ectothrix est susceptible de vivre à l'état de saprophyte; il cultive aisément sur le terreau, les feuilles de mûrier, etc.

INOCULATIONS.

Le parasite du sycosis est inoculable à l'homme et au cobaye. L'inoculation au cobaye est facile : il suffit de prendre un peu de la culture sur une pince à griffes et de pincer la peau de l'animal avec l'instrument.

MICROSPORUM AUDOUINI.

Le microsporum Audouini a été découvert par Gruby dans une affection parasitaire des cheveux qu'il nomma *prurigo decalvans* et qui fut, depuis, confondue avec les pelades et la tricophytie.

Sabouraud a fixé l'entité pathologique de la teigne de Gruby qu'il désigne sous le nom de *teigne tondante rebelle* ou de *teigne tondante de Gruby*. Le parasite de cette affection doit conserver le nom de microsporum Audouini et non prendre celui de tricophyton microsporum que Sabouraud lui avait attribué au début de ses recherches; il diffère entièrement des tricophytons.

Le M. Audouini ne se développe jamais sur la peau glabre; il atteint les seuls cheveux. Ceux-ci ont un aspect spécial; ils se cassent à 6 ou 7 millimètres de la peau, sont très fins, décolorés et revêtus d'une gaine d'apparence épidermique, unie, grise, formée par le parasite; les parties atteintes semblent saupoudrées d'une poussière bleue.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Les cheveux traités par la potasse (Voy. plus haut) se montrent recouverts par une mosaïque de spores ayant 1 à 3 μ de diamètre, rondes ou polyédriques par pression réciproque, agglomérées sans ordre, jamais disposées en chaînettes et possédant une enveloppe claire et transparente. Les spores ne pénètrent jamais à l'intérieur du cheveu. Entre les spores on aperçoit de rares filaments mycéliens très courts, sigmoïdes.

Le microsporum Audouini se développe de haut en bas sur le cheveu; il s'enfonce d'autant plus profondément autour de la portion radiculaire que la lésion est plus ancienne.

CULTURES.

Le cheveu, déposé sur une lame de verre stérile, est coupé en petits fragments dont chacun est porté dans un des milieux utilisés pour le tricophyton ; le plus souvent on obtient une culture pure dès le premier ensemencement.



Fig. 187. — Microsporum Audouini. — Cheveu (Reich. Obj. 8 ; Oc II).

Pomme de terre. — *Culture caractéristique.* — Au bout de sept à huit jours strie grisâtre puis brun rougeâtre. Vers le dixième ou douzième jour apparaît sur cette strie un duvet rare, court, formant par places de petits bouquets.

La culture sur pomme de terre garde plusieurs mois sa vitalité ; dans les mêmes conditions le tricophyton meurt en dix-huit jours.

Moût de bière gélosé. — Au bout de trois à quatre jours touffes de mycélium radié pénétrant dans la gélose et prenant l'aspect soyeux des graines de peuplier ; puis, du centre de la colonie émerge une touffe de rameaux aériens duveteux en même temps qu'il se forme autour de la culture primitive des cercles concentriques glabres devenant légèrement duveteux à la longue. La culture est blanche.

Dans ces cultures les filaments mycéliens sont d'abord courts, puis ils s'allongent, s'intriquent et se renflent en massue. Au bout de quelques jours les terminaisons mycéliennes émettent de longs filaments contournés en lanière de fouet ; sur ces filaments apparaissent les hyphes sporifères en forme de peignes dont chaque dent porte une spore ; ce mode de sporulation distingue absolument le microsporum du tricophyton.

INOCULATIONS.

Le microsporum Audouini est inoculable au cheval ; une variété de microsporum cause l'ulcère contagieux vulgaire des jeunes chevaux. La longue durée et la contagiosité de la teigne de Gruby ne permettent pas de tenter l'inoculation à l'enfant dont le cuir

chevelu constitue le terrain le plus favorable à l'évolution du microsporum.

MICROSPORUM FURFUR.

Le microsporum furfur, découvert par Eichstedt, est le parasite du *pityriasis versicolor*.

Pour rechercher le M. furfur on détache, par raclage avec une lame peu tranchante, des squames épithéliales au niveau d'une plaque de pityriasis. Ces squames sont traitées sur la lame porte-objet par la

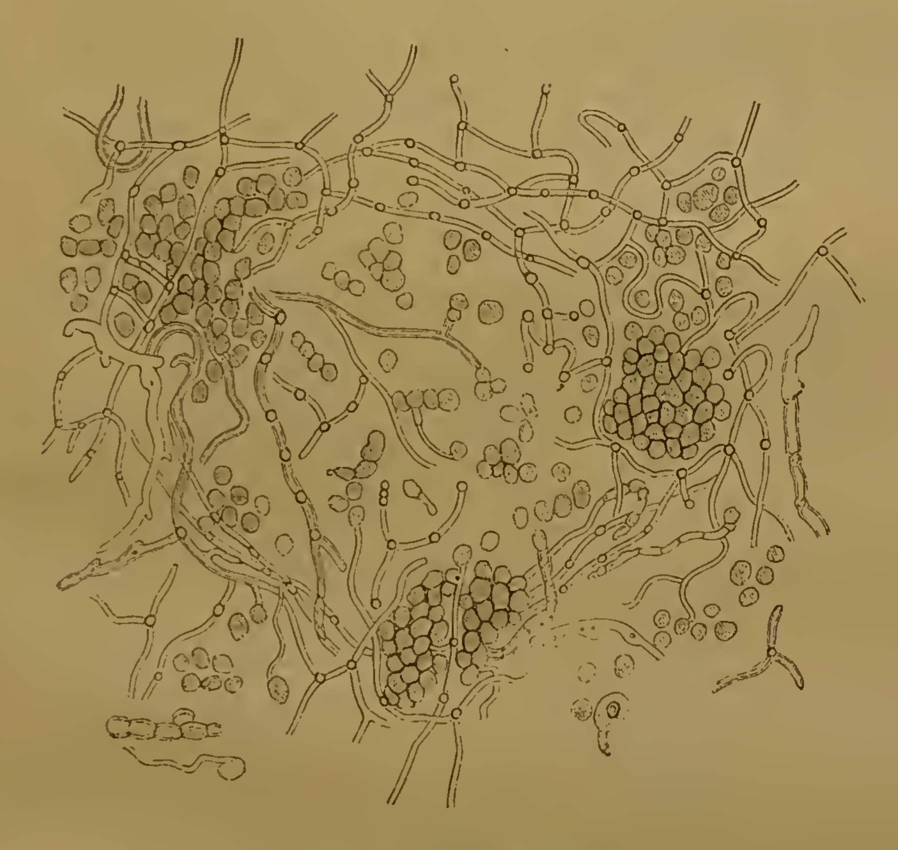


Fig. 188. — Microsporum furfur.

potasse à 40 p. 100 et examinées dans ce liquide; on peut encore traiter les squames par l'acide acétique, puis les monter dans de la glycérine teintée par l'éosine.

Dans les interstices des cellules épithéliales dissociées on voit les amas formés par le parasite ; ces amas sont constitués par des spores et des filaments mycéliens. Les spores sont discoïdes, leur aspect rappelle celui d'un globule sanguin ; elles possèdent un noyau volumineux occupant la presque totalité de la cellule et entouré d'un protoplasma granuleux enveloppé lui-même d'une enveloppe cellulosique.

Les filaments mycéliens sont courts, peu flexueux, souvent contournés en V, peu ramifiés et quelquefois placés bout à bout ; chaque cellule présente un noyau.

Le développement du *Microsporum furfur* est encore mal connu.

MICROSPORUM MINUTISSIMUM.

Burchardt a décrit le *Microsporum minutissimum* comme le parasite de l'*érythrasma*.

On appliquera à la recherche du *Microsporum minutissimum* les mêmes procédés que pour celle du *Microsporum furfur*.

Il est constitué par des filaments mycéliens longs, flexueux, enchevêtrés, rarement ramifiés, divisés en segments placés bout à bout, et par de nombreux amas de spores très fines. Le mode de développement est inconnu.

MOISISSURES SAPROPHYTES.

Un certain nombre de moisissures sont susceptibles de se développer sur les aliments et en particulier sur le pain. L'ingestion d'aliments ainsi altérés peut déterminer des phénomènes d'intoxication ; nous devons passer en revue les moisissures que l'on rencontre le plus fréquemment.

L'examen microscopique des moisissures demande certaines précautions. Le procédé le plus simple consiste à détacher avec des ciseaux fins un petit fragment de la moisissure et à le porter dans une goutte d'alcool sur la lame porte-objet (il ne faut jamais employer l'eau qui mouille mal le végétal et fait éclater les sporanges), puis on recouvre la préparation avec une lamelle et on remplace l'alcool par de la glycérine qu'on fait pénétrer par capillarité (la goutte de glycérine étant déposée sur un des bords de la lamelle, on absorbe l'alcool au bord opposé avec un petit morceau de papier filtre). — On peut encore déposer la moisissure sur la lame porte-objet dans une goutte de solution d'acide osmique à 0,5 p. 100 ; on laisse en contact quelques minutes ; on lave à l'alcool, à l'eau distillée et on monte dans une goutte de glycérine ; on peut colorer la préparation en faisant agir une solution aqueuse de safranine après l'acide osmique.

Pour examiner une colonie entière Salomonsen recommande le procédé suivant : Prendre une colonie peu développée, la placer sur la lame et la recouvrir doucement d'une lamelle ; laisser sécher pendant quelques minutes, puis déposer sur un des bords de la lamelle une grosse goutte de la solution d'acide osmique ; au bout de quelques minutes, quand le liquide a bien imprégné la préparation, l'absorber avec un morceau de papier filtre et le remplacer par de l'eau, substituer enfin à l'eau un peu de glycérine.

Les moisissures se développent de préférence sur les milieux acides : on les cultive aisément sur des tranches de fruits ou de pommes de terre préparées comme d'ordinaire (page 52). On peut encore les cultiver sur des morceaux de pain stérilisés. Pour cela on coupe de petits fragments de pain sur un des côtés desquels on conserve la croûte et on introduit ces fragments dans des tubes à pommes de terre au fond desquels on a mis un peu d'eau. On bouche à l'ouate et on stérilise à 115°-120°.

Penicillium.

P. glaucum est une des moisissures les plus fréquemment rencontrées; il forme des taches vertes sur le pain et la pomme de terre. L'examen mi-



Fig. 189. — Penicillium glaucum.

Fig. 190. — Mucor mucedo.

croscopique le montre constitué par un mycélium ramifié portant des kystes sporifères sur lesquels les spores sont disposées en chaînettes groupées en aigrettes.

Mucor.

Mucor mucedo est très fréquemment rencontré; le développement est

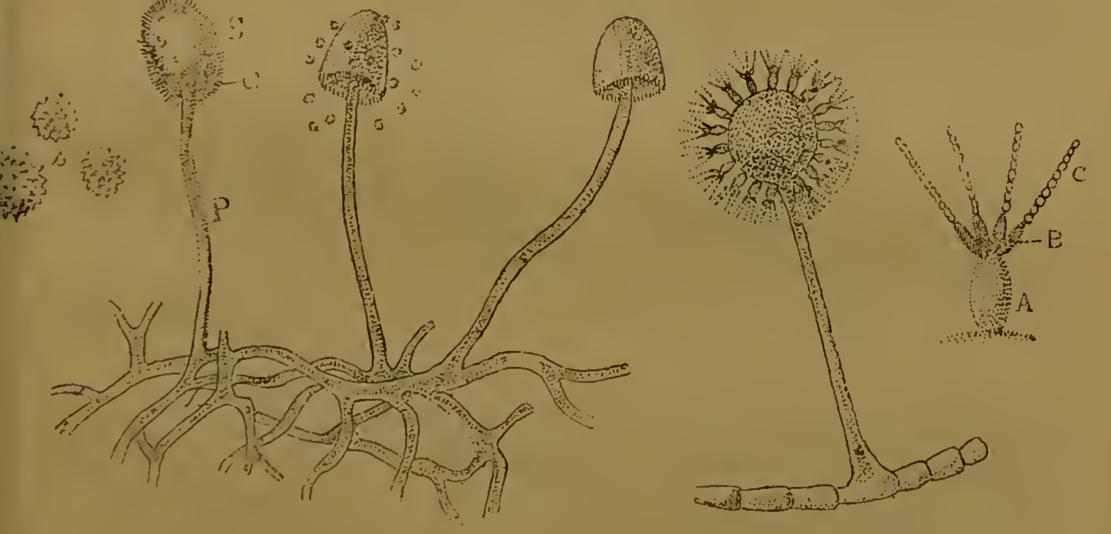


Fig. 191. — Rhyzopus nigricans.

Fig. 192. — Stérygmatocyste niger.

abondant et donne lieu à la formation de hautes touffes blanchâtres analogues à des flocons d'ouate. Du mycélium rameux s'élèvent de hautes

tiges sporifères ou *pédicelles* renflées en *columelles*. Autour de la columelle il se développe une sporange volumineuse, hérissée (S, fig. 190) qui s'ouvre en boîte à savonnette et met en liberté des spores sphériques.

Rhyzopus.

R. nigricans ou *Ascophora nigricans*, espèce dangereuse d'après Mégnin et dont relèveraient la plupart des accidents produits par l'ingestion d'aliments moisis. — Taches noirâtres constituées par un mycélium très abondant, très ramifié, portant des hyphes sporifères terminées par des sporanges globuleuses (S, fig. 191) s'ouvrant par éclatement et renversement de la membrane d'enveloppe pour mettre en liberté des spores sphériques, hérissées.

Stérygmatocyste.

St. niger. Taches noirâtres constituées par un mycélium à filaments courts, associés bout à bout, et portant des hyphes dont l'extrémité libre renflée en boule donne attache à des *cellules basilaires* (A, fig. 192) ; chacune de ces cellules porte 3 à 4 cellules dites *en doigt de gant* (B), supportant les chaînettes de spores (C).

Aspergillus.

A. flavus; *A. glaucus.* Ce genre se distingue du précédent en ce que le renflement de l'hyphe sporifère porte directement les cellules en doigt de

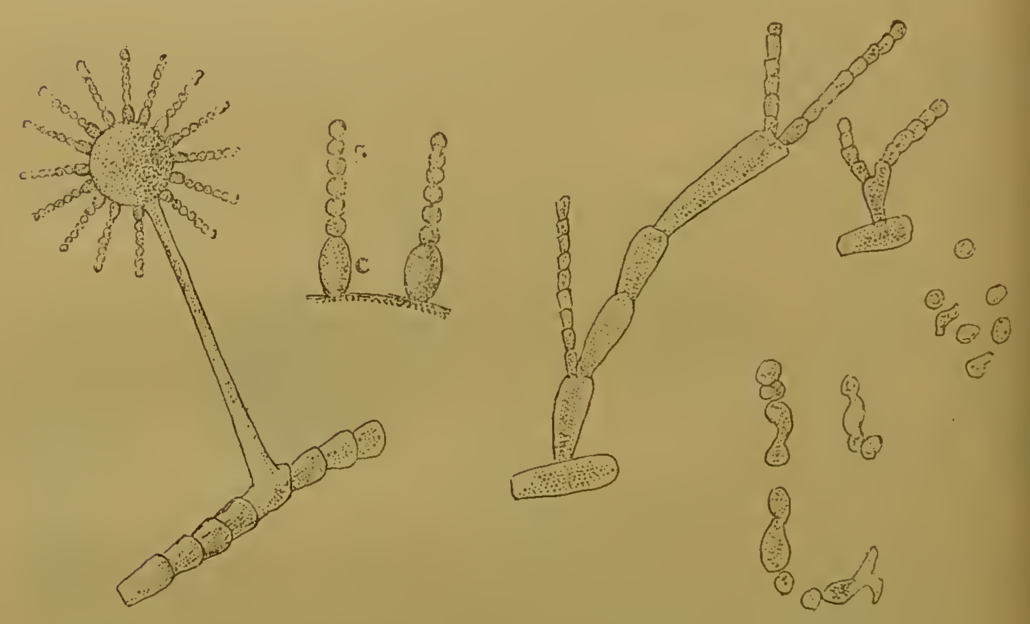


Fig. 193. — Aspergillus glaucus. Fig. 194. — Oïdium lactis.

gant sans interposition de cellules basilaires. La sporange rappelle l'inflorescence de l'oignon.

Oidium.

O. lactis. — Taches grisâtres, muqueuses. Cellules allongées placées bout à bout; les cellules terminales des chaînes portent des colonnettes de spores; de nombreuses cellules sont en voie de bourgeonnement.

CHAPITRE XXIX

LES PROTOZOAIRES

A l'étude des bactéries et des champignons pathogènes on doit joindre aujourd'hui celle des Protozoaires. Depuis quelques années, en effet, ces animaux inférieurs ont pris un grand rôle dans la pathologie animale et humaine.

Les protozoaires parasites des animaux sont beaucoup mieux connus et paraissent infiniment plus nombreux que ceux qui sont susceptibles de causer des maladies chez l'homme; aussi devrons-nous, en sortant un peu du cadre de cet ouvrage, nous occuper des uns et des autres. Nous laisserons de côté toutes les questions qui se rapportent à la classification et à la morphologie pure des protozoaires, renvoyant pour cela le lecteur aux travaux de de Lanessan, Balbiani, Perrier et surtout à l'ouvrage classique de Bütschli; nous nous bornerons à décrire brièvement les diverses espèces pathogènes et à indiquer les moyens à employer pour leur recherche et leur étude.

I. — AMOEBIENS.

Parmi les *Rhyzopodes*, les *amibes* constituent les seuls êtres intéressants au point de vue de la pathologie. On a attribué la dysenterie à l'*Amœba coli*. Avant d'aborder la recherche et l'étude de l'amœba coli, nous conseillons de se familiariser avec l'observation des amibes en utilisant une espèce très répandue, l'*Amœba princeps*.

Amœba princeps. — L'amœba princeps est très facile à observer. On se le procure aisément en laissant macérer un peu de paille dans un vase plein d'eau. Dans une telle infusion on constate au bout de peu de jours, à côté de très nombreuses bactéries et de divers autres protozoaires, des masses de protoplasma granuleux pouvant atteindre jusqu'à 100 μ de diamètre et qui constituent les amibes.

L'amibe ne possède pas de membrane d'enveloppe; dans son protoplasma existe une masse arrondie, très réfringente, rendue très apparente par l'action de l'acide acétique, c'est le noyau. Le picrocarminate d'ammoniaque teinte faiblement le protoplasma et colore

fortement le noyau. Le protoplasma est granuleux, sauf à la périphérie où il paraît plus clair et dépourvu de granulations ; il contient une vacuole contractile.

L'amibe a la propriété de modifier sa forme par l'émission et la rétraction de pseudopodes. De la production des pseudopodes dépend la préhension des aliments et aussi la mobilité de l'amibe : l'amibe est, en effet, très mobile, il se déplace lentement par des modifications successives de sa forme; quand un pseudopode arrive au contact d'une particule solide, il l'entoure, l'englobe et la particule passe à l'intérieur du protoplasma. Si le corps ingéré est propre à servir de nourriture à l'animal, il se dissout peu à peu dans le protoplasma; s'il n'est pas apte à être digéré, il est bientôt rejeté au dehors.

La figure 195 représente les diverses formes prises par un amœba



Fig. 195. — Amœba princeps. Différentes formes prises par l'animal en se déplaçant sous le champ du microscope. (Durée de l'observation 35 minutes).

princeps sous le champ du microscope pendant une période d'observation de 45 minutes.

L'amibe se reproduit par simple division ; l'animal se divise en deux et la bipartition du noyau paraît précéder celle du protoplasma.

Amœba coli. — L'amœba coli a été rencontré par Lösch dans

les selles d'un homme atteint d'une affection ulcéreuse de l'intestin; Koch, Hlava, etc., le décrivirent dans l'intestin des dysentériques; Kartulis s'est fait le défenseur de l'étiologie mibienne de la dysenterie, sa manière de voir a trouvé des partisans (Councilman, Lafleur, Simon, Hlava, Kovacz, Osler, etc.) et des détracteurs (Tancarat, Quincke et Roos, Massiutin, Wilson, etc.).

Il suffira de dire que :

1° La présence des amibes n'est pas constante chez les dysentériques.

Laveran trouve une fois seulement des amibes sur dix cas de dysenterie, Kruse et Pasquale dix fois sur trente-cinq cas, Gasser quarante-cinq fois sur cent cinq cas, nous, même deux fois sur douze cas, Kartulis dix-huit fois sur trente-cinq cas, etc.

2° On rencontre les amibes dans des affections autres que la dysenterie et chez l'homme sain.

Quincke et Roos, chez l'homme sain, dans les selles diarrhéiques produites par l'ingestion d'un purgatif salin, ont trouvé des amibes neuf fois sur vingt et une observations. Dans les fèces d'hommes parfaitement sains, Gasser, Wilson et nous-même avons pu rencontrer des amibes. — D'autre part, Sanarelli a vu chez des cobayes ayant succombé à l'entérite toxique produite par l'ingestion de toxine cholérique le contenu intestinal contenir des amibes en nombre considérable; pour lui les amibes pulluleraient dans l'intestin de ces animaux dans tous les cas d'entérite toxique.

On ne peut donc encore se prononcer sur le rôle des amibes dans la dysenterie.

Morphologie. — L'amœba coli ressemble beaucoup à l'amœba princeps et encore plus à un autre protozoaire très répandu dans les milieux extérieurs, l'*Amœba jelaginia* (Mereschowski).

Il se présente dans les selles sous la forme de masses protoplasmiques de 20 à 60 et même 100 μ de diamètre, affectant d'ordinaire une forme elliptique ou arrondie et n'émettant qu'un seul pseudopode.

Les mouvements sont excessivement lents; l'animal ne parcourt guère en une minute qu'une distance égale à sa longueur.

Le protoplasma granuleux contient un noyau et une ou plusieurs vacuoles; on y rencontre fréquemment des corps étrangers : globules du sang, grains d'amidon, etc.

Recherche. — La recherche de l'amœba coli exige certaines précautions : les selles doivent être examinées aussitôt après leur émission, alors qu'elles sont encore chaudes; l'examen sera fait de préfé-

rence sur une platine chauffante (Voy. p. 131). Quand les matières fécales sont solides, elles doivent être diluées pour l'examen ; la dilu-



Fig. 196. — Amœba coli.

tion sera pratiquée, non dans de l'eau, mais dans une solution tiède de chlorure de sodium à 7 p. 100 ou mieux encore dans le liquide de Grassi fraîchement préparé :

Albumine	0gr,20
Chlorure de sodium	1 gramme.
Eau	200 grammes.

L'examen doit être pratiqué à l'état frais, sans coloration, la gouttelette de matière liquide est simplement déposée sur une lame et recouverte avec une lamelle.

On peut fixer les amibes en faisant pénétrer sous la lamelle, par capillarité, une goutte d'une solution d'acide chromique à 1 p. 100; après fixation il est possible de colorer les amibes en faisant passer sous la lamelle une goutte de carmin aluné.

Cultures. — On n'a pas réussi à cultiver l'amœba coli.

Kartulis obtenait des cultures en ensemençant un peu de matières fécales dans une infusion de paille, mais les amibes ne se développaient qu'à la condition que les flacons ne fussent pas bouchés, même à l'ouate ; comme le fait remarquer Schubert, de telles cultures n'ont aucune valeur, les amibes qui s'y développent ne sont que des impuretés apportées par les poussières atmosphériques.

Inoculation. — Les résultats fournis par les inoculations ont peu d'intérêt, étant donné qu'on ne peut inoculer de cultures pures. Le chat et le chien sont les animaux les plus favorables aux expériences, mais les résultats que l'on a obtenus en leur inoculant des selles dysentériques ne sont pas concluants.

Kovacz a réussi à donner une diarrhée sanguinolente au chat en lui injectant dans le rectum des selles dysentériques. — Kartulis a obtenu le même résultat avec une de ses cultures en infusion de paille. — Zancarol a produit la dysenterie chez le chat (injection rectale) avec des selles contenant des amibes, mais aussi avec du pus d'abcès du foie ne contenant que des streptocoques et même avec des cultures pures de streptocoques.

Le chat, d'ailleurs, présente fréquemment une colite ulcéreuse dysentériforme (Gasser); il en est de même du chien : nous avons observé à Tunis plusieurs chiens atteints de cette colite et nous n'avons pas trouvé d'amibes dans leurs déjections. Chez le chat l'injection rectale de substances irritantes et particulièrement de terre stérilisée produit des ulcérations du colon.

Nous avons tenté de donner la dysenterie au chien par ingestion de matières dysentériques : les animaux recevaient avec la sonde œsophagienne une solution alcaline (bicarbonate de soude 5 grammes, eau 50) pour neutraliser le suc gastrique, et immédiatement après des doses de 10 à 250 centimètres de selles dysentériques; de ces selles, les unes contenaient des amibes, les autres s'en montraient dépourvues. Aucune de nos tentatives n'a été suivie de succès.

II. — SPOROZOAIRES.

Les *Sporozoaires* sont, au point de vue médical, les plus intéressants des protozoaires. Ce sont des êtres monocellulaires, à mouvements lents ou nuls, se reproduisant à l'aide de spores et vivant à l'état parasitaire chez un grand nombre d'espèces animales. Les sporozoaires ont été divisés en cinq groupes que nous devons passer en revue en insistant seulement sur ceux qui présentent un intérêt pour la médecine humaine.

A. — MICROSPORIDIES.

Parmi les microsporidies on ne connait aucun parasite humain ; c'est à ce groupe qu'appartient l'agent de la pébrine des vers à soie, le *microsporidium bombycis*.

Microsporidium bombycis. — Cornalia signala la présence, dans les vers à soie atteints par la pébrine, de corpuscules brillants, ovalaires, réfractaires aux réactifs chimiques; ces *corpuscules de Cornalia* ou *corpuscules vibrants*, bien connus depuis les travaux de Pasteur et de Balbiani, sont les agents de la maladie.

Le microsporidium bombycis est le plus petit de tous les protozoaires il ne mesure que 4 μ de long sur 2 de large. Il est constitué par une membrane d'enveloppe et un contenu qui s'échappe au moment de la reproduction. Les corpuscules sont tantôt ovoïdes, tantôt piriformes ; ils ne possèdent pas de noyau, mais on y voit souvent une vacuole placée vers l'une des extrémités ; parfois il existe une vacuole à chacune des deux extrémités (Balbiani).

Pour étudier le développement du microsporidium bombycis, Balbiani indique le procédé suivant : un papillon de ver à soie corpusculeux est broyé dans un mortier avec un peu d'eau ; avec la bouillie obtenue on badigeonne des feuilles de mûrier que l'on donne comme nourriture à de jeunes vers longs de quelques millimètres seulement. Au bout de quelques jours les vers sont infestés. Les spores se répandent dans le tube digestif et s'introduisent dans les parois de l'intestin où elles produisent de petites masses sarcodiques de dimensions variables, allongées dans le sens des fibres longitudinales de la tunique musculaire. Pour la formation de ces masses sarcodiques les spores se percent par un bout et leur contenu protoplasmique s'échappe sous la forme d'un petit globule qui se meut par des mouvements amiboïdes et grossit dans les tissus ambiants.

Quand les masses sarcodiques ont pris un certain degré de développement, on voit apparaître à leur intérieur de petits globules pâles qui se transforment en corps ovalaires ou piriformes, ce sont là de jeunes spores qui ne tardent pas à être mises en liberté par la résorption de la masse sarcodique ambiante ; ces spores se propagent et vont se développer dans tout l'organisme où elles donnent naissance à de nouvelles masses sarcodiques. C'est ainsi que le parasite franchit les parois du tube digestif et pénètre les glandes séricigènes, les vaisseaux de Malpighi, etc. Pendant l'état de chrysalide, l'envahissement se continue et se propage aux organes nouveaux

qui appartiennent en propre au papillon : le parasite pénètre dans les organes de la reproduction, infecte les faisceaux sperma-

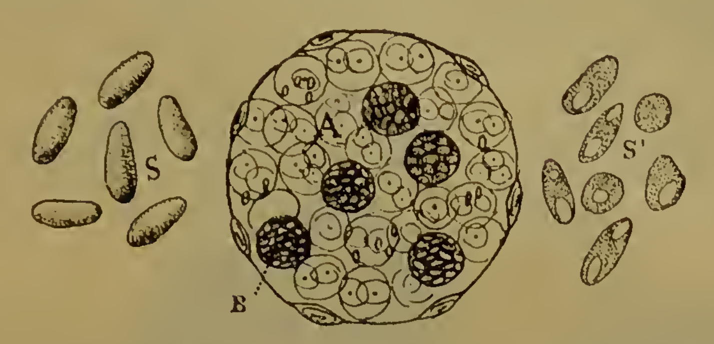


Fig. 197. — Microsporidium bombycis. — B, amas de microsporidies dans un follicule du testicule du ver à soie. — S, spores à l'état de maturité parfaite. — S' spores incomplètement développées (D'après Balbiani).

tiques, les ovules et se transmet ainsi aux nouvelles générations.

Recherche. — Les microsporidies résistent très énergiquement aux agents chimiques. On les observera de préférence à l'état frais, sans coloration, avec l'objectif à sec 8 ou 9. Ils se colorent en violet par le *procédé de Vlacovich* : faire agir pendant quarante-huit heures une solution de potasse à 30 p. 100, traiter ensuite par le liquide de Gram et examiner dans une goutte d'acide acétique cristallisable.

B. — MYXOSPORIDIES.

Les *Myxosporidies* vivent à l'état parasitaire chez les poissons. Ils se développent en abondance dans la peau, les branchies et la plupart des viscères de ces animaux ; seul le système nerveux paraît en être toujours exempt.

Ces parasites ont été étudiés chez le cyprin, la perche, le brochet, la tanche, la merluche, etc., etc.[1]

Recherche. — On recherche de préférence les myxosporidies dans les petites pustules saillantes qui se développent sur les téguments, les kystes sanguins qui se forment sur les ramifications de l'artère splénique (tanches), les kystes des lamelles branchiales, à la surface de la vessie urinaire, de la vessie natatoire, etc.

Pour l'examen on prélève un petit kyste de 2 à 6 millimètres de long et on le transporte sur le porte-objet ; vu sans coloration à l'état frais, le kyste paraît constitué par une membrane d'enveloppe et un contenu. L'enveloppe est assez épaisse, résistante et amorphe ; le contenu est constitué par une substance plus ou moins liquide (colorée par de l'hématoïdine dans les kystes artériels) et renfermant

des granulations diverses et des parasites à différents degrés de développement.

Morphologie. — Les parasites sont très variables quant à la taille (65 à 300 μ) ; leur forme est le plus souvent arrondie, leur protoplasma est finement granuleux ; ils possèdent des mouve-

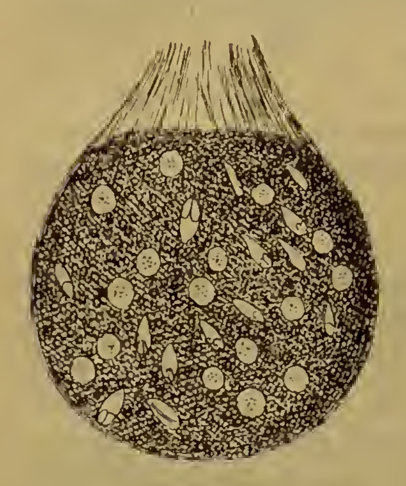


Fig. 198. — Mixosporidie de la Tanche. Kyste développé aux dépens de la tunique conjonctive de l'artère mésentérique et contenant des mixosporidies (D'après Balbiani).



Fig. 199. — Myxosporidie de la Tanche. Corpuscule de Malpighi contenant des mixosporidies. Formes diverses de spores contenues dans le corpuscule; en haut : spores incomplètement développées, à l'état de masses amiboïdes ou de vésicules granuleuses; — à droite : spores complètement développées (D'après Balbiani).

ments très lents et qui ne sont appréciables que quand on pratique l'examen non dans l'eau, mais dans l'urine de poisson.

Dans les myxosporidies ainsi constituées apparaissent à un moment donné des corpuscules qui semblent être des *spores*. Ces spores ont une structure compliquée et très variable; leurs dimensions varient de 8 à 36 μ ; elles sont constituées par une membrane d'enveloppe et un contenu. La membrane d'enveloppe est formée par deux valves, appliquées l'une sur l'autre comme les deux moitiés de la coquille d'une noix, homogènes et transparentes. A l'un des pôles du corpuscule le contenu présente deux vésicules géminées s'allongeant en un petit canal qui vient se fixer à la paroi, au pôle ; à cet endroit on voit une ouverture très fine qui met le corpuscule en rapport avec l'extérieur.

A l'intérieur de chaque vésicule existe un filament enroulé en spirale et très difficile à voir; mais, vient-on à traiter la préparation par une goutte de solution de potasse ou de glycérine, les filaments

se déroulent subitement et sortent à l'extérieur; ces filaments sont parfois très développés et peuvent atteindre 8 à 10 fois la longueur de la spore. En dehors de ces vésicules, le contenu de la spore, constitué par un protoplasma homogène, contient deux à quatre petits globules réfringents.

Pour la reproduction les spores mûres s'ouvriraient par déhiscence des valves pour livrer passage à leur contenu, masse amiboïde qui forme directement une myxosporidie (Balbiani).

C. — SARCOSPORIDIES.

Les *Sarcosporidies* sont des parasites des muscles striés volontaires ou involontaires des mammifères (souris, rat, singe, otarie, bœuf, cheval, chèvre, mouton, etc.) et des oiseaux. On ne les a jamais observés chez l'homme.

On ne sait rien sur la transmission de ces parasites d'animal à animal. Il est probable que le tube digestif est le point de départ de l'infestation ; les parasites émigreraient de là dans les muscles voisins, comme le font les trichines. L'ingestion de chair infectée est-elle dangereuse ? C'est un point encore non élucidé, mais, pour que le danger existe, il serait nécessaire que la viande soit consommée crue ; il n'existe à ce sujet qu'une expérience de Manz qui a obtenu des résultats négatifs en faisant ingérer à des animaux de la chair contenant des sarcosporidies.

Parfois les sarcosporidies se développent en quantité prodigieuse dans les muscles ; cette abondance extrême des parasites s'observe surtout chez le porc et le mouton; les muscles de la paroi œsophagienne, de la langue, le psoas, le diaphragme sont les plus fréquemment envahis.

Des fragments de muscle atteint, examinés au microscope, montrent des tubes allongés (1 à 4 millimètres de long) désignés sous le nom de *tubes de Miescher*, entourés d'une membrane d'enveloppe qui paraît être poreuse et présente parfois des prolongements en forme de soies; le contenu des tubes est formé par des corps de formes très variables, globuleux, ovalaires, en croissant ou réniformes; ces corpuscules mesurent 4 à 6 μ; ils sont fréquemment agglomérés en masses sphériques devenant polyédriques par compression. On ne connaît pas le mode de développement de ces parasites.

D. — GRÉGARINES.

Les *Grégarines* vivent en parasites chez les animaux invertébrés et particulièrement chez les articulés.

Les grégarines ont la forme d'un sac allongé, plus ou moins long (10, 20 μ à 16 millimètres) et constitué par une membrane d'enveloppe et un contenu. La membrane d'enveloppe ne présente aucune ouverture; le plus souvent il existe à la partie antérieure du sac un étranglement cloisonné qui sépare un petit segment hémisphérique plus ou moins allongé (fig. 200); Stein appelle ce segment la *tête*, le reste de l'animal constituant le *corps*. Parfois il existe deux étranglements; certaines espèces, au contraire, ne possèdent qu'une seule cavité intérieure.

Le segment antérieur porte chez certaines espèces des organes de fixation, appendices en crochets, disques, étoiles, etc. A un moment donné le segment muni d'appendices se sépare, l'animal, qui jusque-là avait vécu fixé à la paroi du tube intestinal de son hôte, prend une forme arrondie et devient errant.

Parfois les grégarines se réunissent par deux, bout à bout, sans que les naturalistes s'entendent sur la valeur de cette conjugaison.

Le contenu protoplasmique des grégarines est une substance albumineuse renfermant de nombreuses granulations de nature amyloïde (Bütschli) et dans laquelle on a décrit différentes couches. A l'intérieur du protoplasma se trouve le noyau, d'ordinaire unique, sphérique ou ovoïde et muni d'un nucléole.

A un moment donné la grégarine s'enkyste, devient sphérique, s'entoure d'une épaisse membrane et son noyau disparaît. Ordinairement les kystes formés dans le tube digestif de l'hôte sont rejetés avec les excréments et achèvent au dehors leur évolution.

Les spores se forment dans le kyste ; le plus souvent le protoplasma se divise en deux masses égales, puis ces masses se fusionnent de nouveau et les spores se forment par une sorte de bourgeonnement simultané : à la surface de la masse protoplasmique apparaissent de petites vésicules claires, sphériques, le kyste se remplit de ces vésicules, puis celles-ci se transforment en *navicelles* en prenant une forme ovalaire et en s'entourant d'une substance claire se terminant à chaque extrémité par un prolongement en pointe. A un moment donné les navicelles reprennent leur forme sphérique et s'accumulent contre la paroi interne du kyste en y formant une couche périphérique plus ou moins épaisse; le centre du kyste contient un liquide avec de nombreuses granulations; plus tard enfin, les spores gagnent de nouveau le centre du kyste par un procédé inconnu.

A la maturité, les spores sont mises en liberté par déhiscence du kyste; cette déhiscence peut se faire suivant différents modes plus ou moins compliqués. Les spores mises en liberté sont arrondies ou

affectent la forme d'un navicule ou d'un barillet (la forme des spores sert de caractère pour l'établissement des genres). Dans certains genres le contenu granuleux des spores renferme un noyau le plus souvent accompagné des *corpuscules falciformes* de Schneider.

Il semble que l'infestation se produise par l'ingestion des spores ainsi constituées; dans les organes de l'hôte les spores germeraient; d'après Lieberkühn et Van Beneden, la spore ne produit pas directement une grégarine adulte, mais un corps amiboïde qui se transforme progressivement en grégarine. La figure 200 montre, à droite une grégarine adulte (grégarine géante du homard, *Porospora gigantea*), et à gauche les différentes formes que prend l'animal depuis la phase amiboïde jusqu'à la forme adulte. Tous ces points de l'histoire des grégarines méritent confirmation.



Fig. 200. — Grégarine géante du homard — A droite, forme adulte. — A gauche, formes de l'animal aux différentes phases de développement depuis le stade amiboïde jusqu'à la forme adulte (D'après V. Beneden).

E. — LES COCCIDIES.

Les *Coccidies* (*Psorospermies oviformes* de Leukart) sont toutes des parasites; elles se développent tantôt chez les Vertébrés, tantôt chez les Invertébrés. Ce groupe d'animaux inférieurs intéresse la médecine humaine : on y fait rentrer les parasites que l'on a observés dans le cancer et l'hématozoaire du paludisme.

Coccidium oviforme. — Dans le foie du lapin on rencontre fréquemment des masses blanchâtres ou jaunâtres, ressemblant à de petits abcès ramollis, logés dans les canalicules hépatiques et contenant des corps ovales, semblables à des œufs de Nématodes et qui

sont en réalité des coccidies. Ils possèdent une membrane d'enveloppe réfringente, un protoplasma granuleux, un noyau et un nucléole.

Quand on délaye dans un peu d'eau le contenu d'un kyste et qu'on porte la préparation sous le microscope on voit nettement le parasite; les coccidies prennent mal les matières colorantes : une goutte de solution aqueuse d'éosine ajoutée à la préparation teinte le fond en rose tandis que les parasites restent incolores.

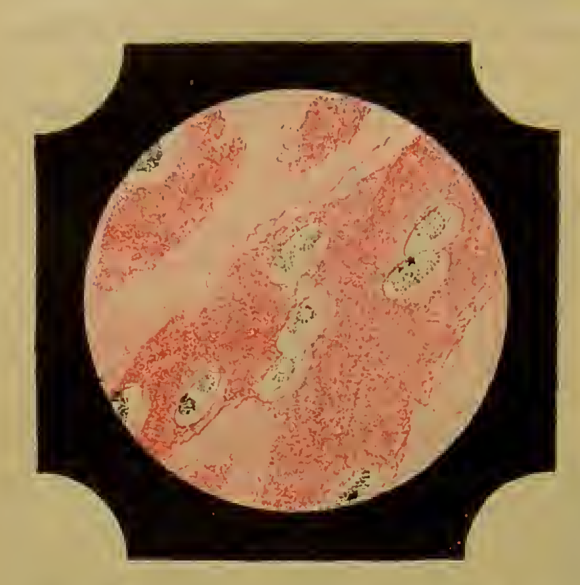


Fig. 201. — Coccidie du lapin. Pulpe de foie colorée à l'éosine ; les parasites restent incolores.

Les coccidies ont toujours un siège intra-cellulaire ; le coccidium oviforme se rencontre à l'intérieur des cellules épithéliales des conduits biliaires.

Dans l'organisme du lapin les coccidies revètent toujours la forme que nous venons de décrire, mais, observées dans d'autres conditions, à l'extérieur de l'organisme, elles présentent un cycle de transformations. Vient-on à recueillir un peu du contenu d'un kyste et à le délayer dans une goutte d'eau stérile ou d'une solution très faible de bichromate de potasse disposée dans une cellule de Koch, on assiste à la formation des *spores*. Le contenu de la coccidie se segmente en quatre parties, chaque segment s'arrondit et donne naissance à une spore analogue à la navicelle des grégarines ; la spore s'allonge et à son intérieur apparaissent deux *corpuscules falciformes* ou *corps en croissant*.

Les spores ingérées par le lapin produisent l'infestation : dans le tube digestif, les spores mettent en liberté les corps en croissant, ceux-ci donnent naissance à des corpuscules amiboïdes qui pénètrent les cellules épithéliales et s'y enkystent pour former les corps ovales que nous avons décrits plus haut (1). Le cycle des transformations à l'intérieur de l'animal est encore mal connu. Toujours

(1) Pfeiffer a vu que la coccidiose du lapin pouvait encore se développer suivant un autre mode ; chez les jeunes lapins il a observé une division en rosace, puis la formation de nombreux corps en croissant. Ce mode de développement constituerait la forme de coccidiose la plus redoutable pour le lapin.

est-il que l'ingestion des corps ovales que l'on trouve dans l'organisme du lapin est impuissante à produire l'infestation. Pour que celle-ci se réalise il faut que la coccidie ait pris la forme sporulée dans les milieux extérieurs. La transmission de la maladie n'est possible qu'après une maturation du germe hors de l'organisme. La coccidiose du lapin est le type des maladies telluriques et, à ce point de vue, on ne saurait trop la rapprocher du paludisme.

Coccidium perforans. — Espèce voisine de la précédente, se développant dans l'intestin du lapin et de quelques autres animaux. La forme adulte se rencontre à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin ; les spores contenant des corps en croissant se développent aisément dans les excréments du lapin.

On rencontre des coccidies analogues dans l'intestin de l'homme (Kjellberg, Eimer, Rivolta et Grassi, Gubler, Lindermann, etc.); mais il semble que dans les cas étudiés jusqu'à présent la présence du parasite n'était liée à l'existence d'aucune affection spéciale.

Klossia helicina. — La klossia helicina constitue une excellente espèce pour l'étude des coccidies; c'est à ce titre que nous en dirons quelques mots. Elle se développe dans l'organisme de l'Helix hortensis où on la trouve presque à l'état constant.

Salomonsen recommande d'opérer ainsi qu'il suit pour l'étude de la klossia :

Écraser la coquille d'un Helix hortensis au niveau du deuxième tour de spire, près de l'orifice. Après avoir enlevé les débris de coquille on aperçoit une partie du poumon et le péricarde au travers duquel on voit battre le cœur; à côté de celui-ci apparaît une masse fusiforme et grisâtre, le rein. On saisit le rein avec une pince, on le détache avec des ciseaux et on en porte une parcelle sur une lame de verre; la préparation est simplement recouverte d'une lamelle.



Fig. 202. — Klossia helicina. — Cellule rénale de l'helix hortensis renfermant trois jeunes klossia; le noyau de la cellule est placé vers l'extrémité étirée du pédoncule (D'après Balbiani).

A l'examen microscopique, on y voit, à côté de cellules normales, des cellules dilatées par des Klossia (fig. 202). Le parasite fait son évolution entière dans la même cellule. A l'intérieur de la coccidie se produisent des masses sphériques qui s'entourent d'une membrane épaisse. Les vésicules ainsi formées constituent de véritables spores; à leur intérieur

apparaissent un noyau et des corps en croissant. Mis en liberté ces corps en croissant possèdent des mouvements et ne tardent pas à prendre l'aspect de corpuscules amiboïdes; ces corps amiboïdes pénètrent dans les cellules épithéliales des canalicules du rein et y recommencent leur cycle d'évolution (H. Kloss).

PARASITES DES TUMEURS.

Depuis quelques années on a signalé la présence dans les tumeurs malignes de parasites ressemblant d'une façon frappante aux formes jeunes de la coccidie du lapin ; de plus on a noté qu'il existe de grandes analogies histologiques entre les véritables tumeurs épithéliales et la néoplasie épithéliale des canaux biliaires du lapin atteint de coccidiose.

Malassez et ses élèves ont les premiers signalé la présence de parasites animaux dans la *psorospermose folliculaire* et la *maladie de Paget* (Malassez, Darier, Wickam). La présence des coccidies dans la maladie de Paget a été confirmée depuis par Salomonsen. Bientôt Albarran décrivait des parasites analogues dans un *cancer* de la mâchoire ; à la même époque, Reisser signalait dans le *Molluscum contagiosum* des amas de cellules ovalaires qui, d'après lui, présentaient les caractères ordinairement attribués aux coccidies, mais il a été démontré qu'il ne s'agissait pas, dans ce cas, de parasites mais bien de cellules épithéliales dégénérées. — Foa, Soudakewitch, Ruffer et Walker ont décrit enfin, dans les cellules cancéreuses, des parasites appartenant à n'en pas douter à la classe des Sporozoaires et particulièrement au groupe des coccidies.

Soudakewitch a examiné 110 cancers de différentes provenances et y a constamment rencontré des coccidies.

Dans ses recherches Soudakewitch fixait les fragments de tissus cancéreux à l'aide d'une des méthodes suivantes :

a). Immersion de quarante-huit heures dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100, suivie d'un séjour de trois à cinq jours dans le liquide de Muller.

b). Immersion dans la solution aqueuse saturée de sublimé.

c). Immersion dans le liquide de Flemming.

Les pièces fixées par un de ces trois procédés étaient incluses dans la celloïdine.

Les coupes fixées par le liquide de Flemming étaient colorées à la safranine (séjour de un à deux jours dans la solution aqueuse, puis décoloration par l'alcool acidulé par l'acide azotique ou par une solution aqueuse faible d'acide picrique).

Les coupes fixées par l'acide osmique étaient colorées par l'hématoxiline vieille de Ranvier.

Dans les cellules cancéreuses Soudakewitch constate la présence de petits corps arrondis, sphériques, refoulant et comprimant le noyau; ces corps possèdent une membrane d'enveloppe, un protoplasma finement granuleux et un noyau. Leurs dimensions peuvent atteindre celles d'un leucocyte ; le plus souvent il n'existe qu'un parasite dans la même cellule, quelquefois on peut en constater deux, trois ou même cinq. Après coloration à l'hématoxyline il peut apparaître à l'intérieur du parasite des complications de structure fort diverses et dont les figures ci-dessus, reproduites d'après les dessins de Soudakewitch, donnent une idée. Les parasites du cancer doivent être étudiés avec l'objectif 8 ou 9 à sec.



Fig. 203. — Parasites du cancer (D'après Soudakewitch).

Les cellules envahies par le parasite présentent d'ordinaire une hypertrophie considérable et sont en voie de reproduction karyokinétique; parfois encore on note la nécrose du noyau et la destruction du protoplasma cellulaire. Le parasite pénètre dans le corps de la cellule, y végète, refoule le noyau puis le protoplasma à la périphérie. A la destruction de la cellule envahie est liée la libération du parasite, la capsule de celui-ci se rompt elle-même et les spores mises en liberté infestent les cellules voisines. Mais le mode de propagation le plus important est celui qui emprunte la voie intra-cellulaire : la cellule cancéreuse se divise par karyokinèse et donne deux cellules filles toutes deux infestées.

Telles sont les principales données que nous possédons sur les parasites du cancer ; le travail de Soudakewitch constitue un apport très important à leur histoire. Metchnikoff qui a examiné les prépa-

rations de Soudakewitch admet la nature coccidienne des parasites décrits par ce savant.

Tous les auteurs n'acceptent pas sans restrictions les résultats des travaux que nous venons de signaler, et la nature parasitaire du cancer n'est pas encore universellement reconnue.

LES HÉMATOZOAIRES.

L'hématozoaire du paludisme.

Laverania hematobia.

L'agent pathogène du paludisme a été découvert par Laveran ; c'est un parasite polymorphe appartenant à la classe des Sporozoaires. L'hématozoaire de Laveran se rencontre dans le sang des paludéens sous une des quatre formes suivantes :

1° *Corps sphériques.* — Les corps sphériques constituent la forme la plus communément observée ; ce sont de petits éléments dont la taille varie de 1 à 6 μ et qui sont formés par une substance hyaline, incolore, transparente. Ils sont animés de mouvements amiboïdes, d'où le nom de *corps amiboïdes* qui leur est parfois donné. Les corps sphériques apparaissent d'ordinaire comme de petites taches claires accolées aux globules rouges, une même hématie pouvant porter 2, 3 et même 4 de ces corps ; parfois ils sont libres dans le sérum.



Fig. 204. — Hématozoaire du paludisme. Corps sphériques. (Grossissement 330 diamètres.)

Les plus petits des corps amiboïdes présentent parfois un ou deux grains de pigment noir ; à mesure que le volume du parasite augmente les grains de pigment deviennent plus nombreux ; ces grains sont disposés tantôt en couronne à la périphérie de l'élément amiboïde, tantôt en agglomérations irrégulières à l'intérieur de celui-ci ; souvent ils sont animés d'un mouvement vif plus irrégulier et plus inconstant que le mouvement brownien.

Les corps amiboïdes présentent en outre un noyau, placé excentri-

quement, accolé à la paroi et très difficile à colorer. Dans les préparations traitées par le bleu de méthylène, le protoplasma se colore en bleu et le noyau est représenté par une vacuole claire; en faisant agir un mélange de bleu de méthylène et d'éosine (voy. plus loin) on colore en violet, à l'intérieur du noyau, une tache chromatique.

Parfois on voit des corps amiboïdes se segmenter en trois ou quatre éléments de plus petit volume; ces éléments peuvent se séparer ou se confondre de nouveau en une seule masse.

Dans les préparations de sang frais, au bout d'une demi-heure à trois quarts d'heure, les mouvements amiboïdes s'arrêtent et les corps sphériques prennent leurs formes cadavériques; les contours en deviennent irréguliers, les grains de pigments s'accumulent irrégulièrement en certains points.

2° *Flagella.* — Sur les bords des corps sphériques de moyen volume on voit parfois des filaments mobiles ou *flagella* qui s'agitent très rapidement en imprimant aux globules rouges voisins des mouvements variés. Les flagella ont 3 à 4 fois le diamètre des hématies, mais leur transparence et leur finesse sont telles que lorsqu'ils sont au repos il est à peu près impossible de les voir. Sur chaque corps amiboïde il peut exister un à quatre flagella disposés d'une façon symétrique ou groupés sur un même point. Les mouvements de chaque flagellum sont indépendants; le déplacement des flagella imprime souvent des mouvements peu étendus au corps sphérique; tantôt il s'agit d'un simple mouvement oscillatoire sur place, tantôt on observe une véritable translation.



Fig. 205. — Hématozoaire du paludisme. Flagella. (Grossissement 330 diamètres.)

Certains flagella présentent à leur extrémité libre un petit renflement piriforme.

A un moment donné les flagella se séparent des corps amiboïdes, deviennent libres et se déplacent rapidement au milieu des hématies dans le champ du microscope; dès que les flagella se sont détachés, les corps pigmentés se déforment et leurs grains de pigment s'accumulent en amas.

D'après Golgi les flagella sont nombreux dans la fièvre quarte, rares dans la fièvre tierce.

3° *Corps en croissant.* — Les corps en croissant s'observent surtout dans le sang des individus atteints depuis longtemps et présentant de la cachexie palustre.



Fig. 206. — Hématozoaire du paludisme. Corps en croissant. (Grossissement 330 diamètres.)

Ce sont des éléments analogues aux corpuscules falciformes des coccidies. Leur substance est transparente, incolore, excepté à la partie moyenne où se trouve un amas de grains de pigment noir. Leur longueur est de 8 à 9 μ, leur largeur de 2 μ environ. Du côté de la concavité on aperçoit souvent une ligne très fine qui réunit les deux extrémités du croissant. Les corps en croissant nagent dans le sérum ou sont accolés aux hématies.

Laveran a constaté que, parfois, les corps en croissant se transforment en un corps d'abord ovalaire puis sphérique.

4° *Corps en rosace ou en marguerite.* — Les corps en rosace, corps en marguerite, ou corps segmentés, représentent un mode de reproduction (et peut-être le seul) de l'hématozoaire de Laveran. On ne les rencontre qu'en très petit nombre dans les états chroniques ; on les recherchera de préférence à la première période des accès de fièvre. Parfois on ne les rencontre pas dans le sang mais uniquement dans le foie et la rate.

Certains corps sphériques présentent des bords légèrement dentelés en même temps que leurs grains de pigment se réunissent au centre en un seul amas, c'est le premier degré de la segmentation. Bientôt les dentelures deviennent plus profondes, l'aspect en marguerite apparaît, puis chacun des segments se sépare de telle sorte qu'il se produit une série de petits corps sphériques libres et ne contenant pas de pigment. Le pigment n'apparaît que dans les formes adultes.

Les marguerites peuvent présenter un nombre variable de segments, tantôt on en compte 8, tantôt 6 à 20. D'après Golgi les formes à 8 segments se rencontreraient dans la fièvre quarte, celles à 16-20 segments dans la fièvre tierce.

Les auteurs italiens (Golgi, P. Canalis, Grassi et Feletti, etc.) ont voulu distinguer plusieurs espèces dans l'hématozoaire de Laveran. Les uns décrivent un parasite de la fièvre quarte, un parasite de la fièvre tierce et des formes irrégulières, les autres distinguent jusqu'à cinq espèces correspondant à des manifestations cliniques différentes. Mais les observations cliniques et les recherches microscopiques démontrent surabondamment le mal fondé de ces distinctions. « L'hématozoaire du paludisme doit être rangé parmi les sporozoaires à côté des coccidies. Or le polymorphisme est pour ainsi dire de règle dans l'histoire de ces êtres et les différences que l'on constate dans l'évolution de l'hématozoaire du paludisme ne suffisent pas pour autoriser à admettre l'existence de plusieurs variétés distinctes de parasites » (Laveran).

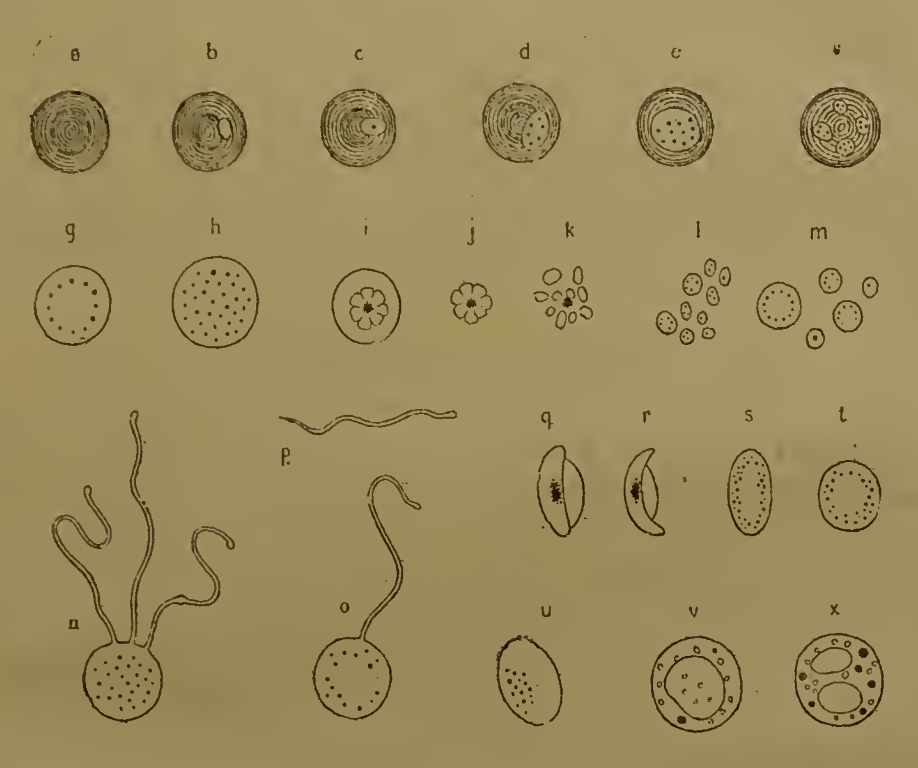


Fig. 207. — Hématozoaires du paludisme (d'après Laveran). — *a*, Hématie normale. — *b*, hématie avec un corps sphérique de très petit volume, non pigmenté. — *c*, *d*, *e*, hématies avec des corps sphériques pigmentés, petits et moyens. — *f*, hématie avec quatre petits corps sphériques. — *gh*, corps sphériques libres ayant atteint leur développement complet. — *i*, corps segmenté adhérent à une hématie. — *j*, corps segmenté libre. — *k*, les segments s'arrondissent et deviennent libres. — *lm*, petits corps sphériques libres. — *n*, corps sphérique avec trois flagella. — *o*, corps sphérique avec un flagellum. — *p*, flagellum libre; *qr*, corps en croissant. — *s*, corps ovalaire. — *t*, corps sphérique dérivé d'un corps en croissant. — *u*, corps sphérique après le départ des flagella. — *vx*, leucocytes mélanifères.

Inoculations. — Le parasite du paludisme n'a jamais été rencontré dans les milieux extérieurs; on n'est pas parvenu à le cultiver artificiellement.

L'hématozoaire est inoculable de l'homme à l'homme (Mariotti et

Ciarocchi, Marchiafava et Celli, etc.). L'inoculation de sang palustre doit être pratiquée dans les veines (Laveran). Huit à dix jours après l'inoculation les parasites apparaissent dans le sang en même temps que se manifestent les symptômes du paludisme.

Le singe est réfractaire ; les diverses tentatives d'inoculation aux animaux et particulièrement aux oiseaux ont toujours échoué.

Recherche. — L'hématozoaire doit être recherché dans le sang des impaludés, de préférence un peu avant les accès ou au début de ceux-ci. Chez certains cachectiques, les parasites se rencontrent dans le sang, même dans l'intervalle des accès, mais, en règle, les parasites disparaissent du sang périphérique pendant les périodes d'apyrexie, surtout quand les malades sont soumis à la médication quinique. Les corps en croissant résistent mieux que les autres formes à cette médication.

A. — La recherche portera de préférence sur le sang frais.

On lave le doigt du malade au savon puis à l'alcool pour débarrasser la peau de toute matière grasse et on en pique la pulpe avec une épingle flambée. La première goutte de sang est essuyée avec un linge fin et les suivantes sont recueillies sur des lames de verre scrupuleusement propres (Voy. p 127). Chaque goutte de sang est immédiatement recouverte d'une lamelle. Quand la goutte de sang est un peu grosse on presse légèrement sur la lamelle et on essuie le sang qui suinte sur les bords de celle-ci, de manière à obtenir une couche de sang très mince dans laquelle ces hématies soient étalées à plat et non disposées en piles. Il est inutile de border à la paraffine, le sang, en se coagulant sur les bords de la préparation, formant une occlusion suffisante. La préparation doit être examinée avec l'objectif 8 ou 9.

B. — On peut encore utiliser, pour la recherche et l'étude de l'hématozoaire, des lamelles de sang desséchées.

Pour cela on prépare des lamelles de sang selon la méthode ordinaire (Voy. p. 100); les lamelles sont séchées à l'air puis fixées dans la flamme. Pour l'examen, ces lamelles sont montées à sec par simple application sur une lame porte-objet à laquelle on les fixe en bordant à la paraffine.

Coloration. — Les hématozoaires peuvent être colorés par divers réactifs, en particulier par le bleu de méthylène, le violet de gentiane, le violet dahlia et l'hématoxyline de Boehmer. En général l'examen des préparations colorées est moins instructif que celui des préparations fraîches.

Pour la coloration, les lamelles de sang sont préparées comme nous l'avons dit plus haut ; après l'action de la chaleur, il est bon de

compléter la fixation en versant sur la préparation quelques gouttes d'alcool-éther.

1° *Bleu de méthylène.* — *a*) Faire agir sur la lamelle pendant trente secondes une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène, laver, sécher et monter dans le baume. Les globules rouges ne sont pas colorés, les noyaux des leucocytes et les parasites fixent le bleu, ces derniers restent plus pâles.

b) Faire agir d'abord une solution d'éosine à 0,5 p. 100, puis colorer avec la solution aqueuse de bleu et terminer comme plus haut : on obtient ainsi une double coloration, les hématies sont colorées en rose, les noyaux des leucocytes et les parasites en bleu. Ce procédé est celui que recommande Laveran.

c) Colorer les lamelles par le mélange éosine-bleu de méthylène de Chenzinsky (Voy. p. 214).

2° *Violets.* — Le violet de gentiane ou le violet dahlia en solution aqueuse saturée sont laissés en contact seulement quelques secondes avec les lamelles ; puis on lave, on sèche et on monte dans le baume de Canada. Les hématies ne sont pas colorées ; les noyaux des globules blancs et les parasites sont teintés en violet ; les grains de pigment sont peu visibles.

Coloration des noyaux. — Le procédé de Romanowsky permet de colorer dans le noyau des hématozoaires une tache chromatique.

Les lamelles fixées dans la flamme sont placées à l'étuve sèche entre 105° et 110° pendant une heure environ, puis elles sont plongées pendant au moins une heure dans le bain suivant, préparé fraîchement :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène.............	2 vol.
Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100.......................	5 vol.

Au sortir du bain colorant, les lamelles sont lavées à l'eau, séchées et montées dans le baume.

Hématozoaires des animaux.

Le sang d'un grand nombre d'animaux peut contenir des parasites très analogues à l'hématozoaire du paludisme ; parmi ces animaux, il faut citer la grenouille, le lézard et surtout les oiseaux.

Les parasites du sang des oiseaux ont été étudiés principalement par Danilewsky. Danilewsky, Grassi et Feletti ont voulu les identifier à l'hématozoaire de l'homme, mais Laveran, qui a étudié les hématozoaires chez le geai, le pinson et le pigeon, n'admet pas cette identification.

Les hématozoaires des oiseaux sont le plus souvent accolés à la surface ou inclus dans l'intérieur des hématies. Les corps sphériques sont les plus fréquemment observés, parfois ils deviennent ovoïdes ; ils déforment et détruisent progressivement l'hématie et sont mis en liberté. Les corps

sphériques devenus libres présentent des mouvements oscillatoires rapides et se garnissent de flagella ; bientôt les flagella se détachent.

Les corps en marguerite sont rarement observés.

Il n'est pas démontré que ce parasite ait une action pathogène et fébrigène ; d'ordinaire il ne donne lieu à aucun trouble apparent chez les animaux qui en sont porteurs ; cependant Danilewsky a constaté qu'à certains moments ces animaux deviennent malades et peuvent même succomber : leur sang renferme alors des corps en marguerite.

Les oiseaux ne sont pas sensibles à l'inoculation de l'hématozoaire humain ; on peut, au contraire, les infecter en leur inoculant le sang d'un oiseau de même espèce et contenant des hématozoaires (Celli et San Felice, Laveran).

L'inoculation dans les veines de l'homme de sang de pigeon infecté n'a donné aucun résultat entre les mains de Mattei.

La quinine, active vis-à-vis de l'hématozoaire de l'homme, est sans action sur les hématozoaires des oiseaux.

III. — INFUSOIRES.

Les *infusoires* sont des protozoaires libres, pourvus d'une membrane d'enveloppe traversée par des *flagella*, ou des *cils vibratiles*, ou des *tentacules*. Les deux classes des I. flagellifères et des I. ciliés sont es seules qui nous intéressent.

INFUSOIRES FLAGELLIFÈRES.

Ce sont des infusoires dont l'appareil locomoteur est essentiellement constitué par de longs filaments contractiles, dits *flagella* ou *fouets*. Nous étudierons les *Trypanosoma*, *Cercomonas* et *Trichomonas*.

TRYPANOSOMA.

Les *trypanosomes* (Gruby) vivent à l'état de parasites dans le sang d'un grand nombre d'animaux ; on ne les a jamais rencontrés chez l'homme. Ce sont des infusoires possédant une membrane ondulante fixée le long du corps et un ou plusieurs flagella.

Recherche. — On recherche les trypanosomes par les procédés que nous avons indiqués à propos des hématozoaires.

Trypanosomes des oiseaux. — Découverts par Wedl, ils ont été décrits par Danilewsky dans le sang de plusieurs espèces d'oiseaux. On les rencontre dans le sang et la moelle osseuse. Ils sont constitués par un corps fusiforme, grisâtre, possédant un noyau sphérique, et dont l'extrémité antérieure se termine par un flagellum plus ou moins long ; une membrane ondulante, hyaline s'étend du flagellum à l'extrémité postérieure du parasite. Le trypanosome est animé d'un mouvement spiraliforme, le flagellum étant

dirigé en avant. La longueur du trypanosome varie de 18 à 60 μ, non compris le flagellum (fig. 208).

A un moment donné, le trypanosome prend la forme amiboïde, le flagellum et la membrane ondulante se rétractent, le parasite devient sphérique et il entre en segmentation. Les parasites pro-

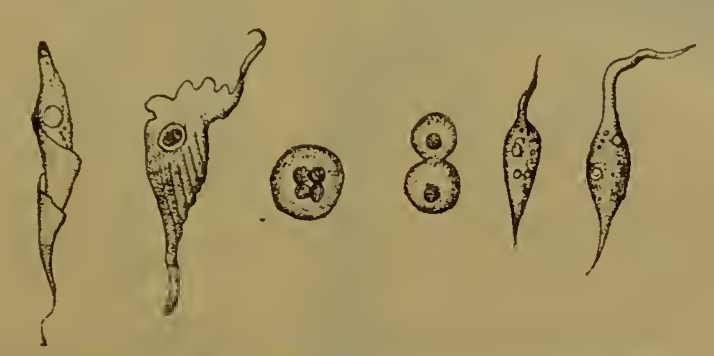


Fig. 208. — Trypanosome des oiseaux (d'après Danilewsky).

venant de la segmentation des corps amiboïdes sont sphériques et munis d'un noyau, puis ils s'allongent, deviennent piriformes, leur extrémité antérieure s'étire en un flagellum très mobile, leur extrémité postérieure est plus ou moins effilée (*trypanomonas* de Danilewsky). Les trypanomonas peuvent eux-mêmes se multiplier par division longitudinale; cette division commence toujours par l'extrémité antérieure du flagellum. (Ces formes se rencontrent peu dans le sang périphérique, mais elles sont fréquentes dans la rate et la moelle osseuse.) Après une période de temps assez longue les trypanomonas prennent la forme du trypanosome. Parfois aussi le trypanosome se reproduit par simple division longitudinale, sans passer par la forme amiboïde.

Les trypanosomes peuvent vivre cinq à huit jours dans du sang conservé purement dans une pipette; dans les mêmes conditions, les trypanomonas vivent dix à douze jours.

Trypanosomes de la grenouille (*Undulina ranarum*). — Ces trypanosomes ont été étudiés par Gluge, Mayer, Gruby, Ray-Lankester, etc. Chalachnikow en a distingué plusieurs espèces, les unes ont une forme plate, les autres sont disposées en éventail ou en corne d'abondance, le flagellum se trouvant à une des extrémités du bord ondulé.

Trypanosomes des poissons. — Découverts dans le sang de la truite par Valentin, ils ont été observés dans le sang d'un grand nombre de poissons par Remak, Berg, Danilewsky, Chalachnikow, etc. Ce dernier auteur distingue deux variétés de parasites : l'une est analogue au trypanosome des oiseaux, l'autre est plate,

étalée comme le trypanosome de la grenouille. Ces deux formes ne sont probablement que deux aspects du même parasite (fig. 209).

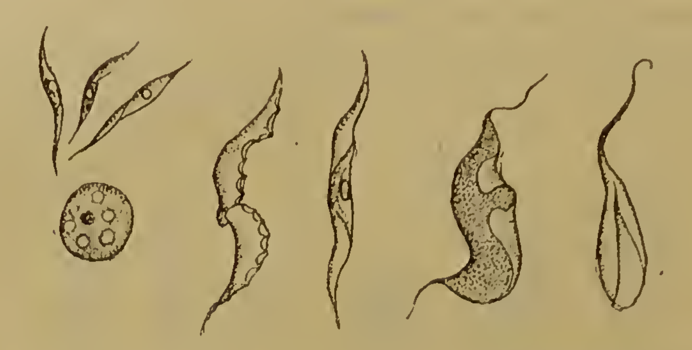


Fig. 209. — Trypanosome des poissons (d'après Chalachnikow).

La reproduction a lieu comme chez les trypanosomes des oiseaux : le flagellum disparaît, le corps amiboïde ainsi formé se segmente et produit des trypanomonas qui prennent ensuite la forme adulte.

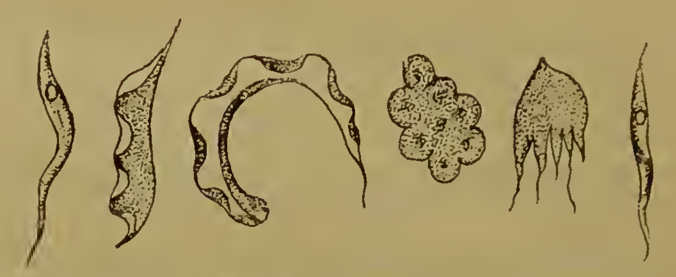


Fig. 210. — Trypanosome du rat (d'après Chalachnikow).

Tripanosomes des mammifères. — On en distingue plusieurs espèces.

Trypanosome du rat (fig. 210). — Découvert par Gros et Chaussat et décrit par Lewis, Croosksbank, Danilewsky et Chalachnikow.

Dans le sang frais, le trypanosome du rat est aplati, fusiforme, souvent enroulé sur lui-même; il possède un noyau qui a l'apparence d'une tache claire ; une de ses extrémités se termine par un flagellum.

Dans les préparations fixées par l'acide osmique ou l'alcool-éther, on voit une des extrémités du parasite se terminer par un prolongement tranchant, l'autre, par un long flagellum; sur les bords la membrane ondulante forme une série de replis.

Chalachnikow est arrivé à cultiver le trypanosome du rat dans du sang de chien recueilli purement ; il a constaté que la reproduction de ce parasite se fait de la même façon que chez les trypanosomes des oiseaux : formation de *corps amiboïdes* ou *pseudo-leucocytes*, division de ces corps en éléments jeunes ou trypanomonas; parfois les corps amiboïdes se divisent longitudinalement en

prenant l'aspect d'un peigne dont chaque dent correspond à un trypanomonas; bientôt après ces trypanomonas se séparent.

Trypanosomes des chameaux et des chevaux. — Griffith-Evans a décrit une maladie, la *surra*, qui sévit dans l'Inde sur les équidés et les chameaux et qui est produite par un trypanosome. Ce trypanosome, désigné par Steel sous le nom de *Spirochæta Evansii*, par Danilewsky sous celui de *Herpetomonas Lewisii*, a été étudié par Lewis, qui l'identifie avec celui du sang du rat (1).



Fig. 211. — Trypanosome du cheval (d'après Rouget).

Rouget a trouvé dans le sang d'un étalon atteint de *dourine*, à Constantine, un trypanosome analogue à celui de Lewis. Ce trypanosome est fusiforme, sa partie postérieure s'allonge en flagellum, il est pourvu sur l'un de ses bords d'une membrane ondulante plus ou moins plissée, et possède un noyau réfringent situé vers son extrémité antérieure. Ses dimensions sont de 18 à 26 μ de long sur 2 à 15 μ de large vers la partie moyenne du corps. Il est très mobile; la mobilité persiste encore dans les préparations de sang frais au bout de dix-huit heures (fig. 211).

Rouget n'a pas réussi à cultiver le trypanosome dans le sang des animaux réceptifs. L'inoculation a échoué chez les animaux à sang froid, les oiseaux et le cobaye; elle a donné des résultats positifs chez la souris, le rat blanc, le chien et le lapin.

L'inoculation aux animaux réceptifs se fait très aisément par injection d'une trace de sang infecté sous la peau, dans le péritoine et dans les veines; il suffit même de déposer une goutte de sang infecté sur une excoriation superficielle de la peau ou sur une muqueuse non excoriée pour déterminer l'infectation. L'absorption par les voies digestives est toujours restée inactive. Dans un cas le sperme d'un lapin contenait le parasite et l'animal a pu contaminer par la voie génitale une femelle neuve.

Après l'inoculation, le parasite se généralise rapidement dans le sang : les souris succombent en cinq à onze jours, le parasite

(1) D'après D. Bruce, la maladie de la mouche tsé-tsé serait due à la présence dans le sang d'un trypanosome analogue à celui de la surra.

fourmille dans le sang et la pulpe des viscères. Chez le lapin infecté, le trypanosome ne se rencontre pas constamment dans le sang, mais y apparaît d'une manière intermittente; il se produit une fièvre irrégulière, sans qu'il existe aucune relation entre les paroxysmes fébriles et la présence du trypanosome dans le sang; l'animal présente des symptômes caractéristiques : œdème et eschares des oreilles, conjonctivite muco-purulente, tuméfaction et eschares des organes génitaux externes, paraplégie, cachexie et mort au bout de deux à quatre mois. Chez le chien, les troubles oculaires dominent (conjonctivite, kératite, hypopion), on note également des troubles paralytiques et de l'œdème des organes génitaux externes.

Rouget ne décrit point le mode de reproduction de son trypanosome.

Trypanosome du lapin. — Jolyet et de Nabias ont décrit un trypanosome dans le sang des lapins. Ce parasite est fusiforme, pourvu d'un flagellum à sa partie postérieure et d'une membrane ondulante, étroite, visible seulement dans les préparations colorées. Le parasite possède un noyau, il mesure 30 à 36 μ de long, y compris le flagellum, et 2 à 3 μ de large à sa partie moyenne; il est animé de mouvements très vifs. On ne connaît pas son mode de reproduction.

Trypanosome du cobaye. — Dans le sang du cobaye, Künstler a rencontré un parasite analogue au trypanosome de Jolyet et de Nabias.

CERCOMONAS.

Cercomonas termo. — Cet infusoire abonde dans les infusions végétales; on pourra s'exercer avec lui à l'étude de cette catégorie de protozoaires. L'examen de ces êtres est rendu difficile par leur extrême mobilité: on ne peut en étudier les détails de structure qu'en les fixant par l'acide osmique ou l'acide chromique, comme nous l'avons dit à propos des amibes.

Le *C. termo* (fig. 212) est constitué, à l'état jeune, par un corps ovoïde portant au niveau d'une de ses extrémités un long flagellum très mobile. Le protoplasma est granuleux, il est entouré d'une membrane d'enveloppe et contient un noyau sphérique colorable par le carmin; dans la forme adulte le corps prend une forme allongée, et, à côté du noyau, apparaissent de nombreuses vacuoles contractiles.

Les matières alimentaires sont introduites dans le protoplasma par un point déterminé situé à la base du flagellum; à cet endroit, la membrane d'enveloppe présente une interruption au niveau de laquelle le protoplasma renferme une vacuole dans laquelle se rassemblent les particules alimentaires; puis la vacuole gagne le

centre du protoplasma et les aliments y subissent la digestion. Les corps étrangers non alimentaires qui ont été ingérés sont rejetés par l'orifice qui a servi à leur introduction (Bütschli).


Fig. 212. — Cercomonas termo.

La reproduction a lieu par segmentation longitudinale; la bipartition commence par le noyau, puis le protoplasma se divise au voisinage du flagellum et la séparation des deux moitiés se produit graduellement ; un flagellum se développe sur la moitié qui en était dépourvue.

Cercomonas intestinalis. — Se rencontre fréquemment dans les matières fécales; certaines selles diarrhéiques en contiennent un grand nombre; il n'a néanmoins aucune signification pathologique. Il a été découvert par Davaine (fig. 213).

Il importe de rechercher le *C. intestinalis* dans les excréments encore chauds, cet être mourant rapidement quand les selles se refroidissent. On prendra dans cette recherche toutes les précautions que nous avons indiquées à propos des amibes; s'il en est besoin, les selles seront diluées dans la solution de chlorure de sodium ou dans le liquide de Grassi tièdes (Voy. p. 530).



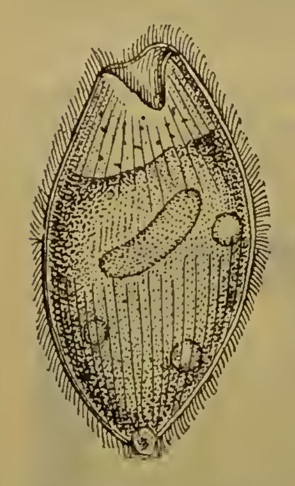
Fig. 213. — A, cercomonas intestinalis. — B, trichomonas vaginalis.

Le *C. intestinalis* est piriforme, sa longueur varie de 8 à 12 μ. Davaine en distingue deux espèces d'après la longueur. De l'extrémité antérieure du corps part un flagellum long de 2 à 4 μ, très mobile; l'extrémité postérieure du corps se termine en pointe. La structure est analogue à celle du *C. termo*, la reproduction a lieu par division longitudinale.

TRICHOMONAS.

Trichomonas intestinalis. — Ce protozoaire, décrit par Marchand, se rencontre dans les selles diarrhéiques; il semble ne posséder aucun pouvoir pathogène. Sa forme est ovale. Il possède une membrane d'enveloppe et un protoplasma muni d'un noyau et de vacuoles contractiles. Il mesure 10 à 15 μ de longueur; son extrémité postérieure s'étire en un filament caudal, long de 2 à 3 μ; il porte sur le côté 11 à 12 cils vibratiles disposés en peigne. Il est animé de mouvements très vifs.

Trichomonas vaginalis. — Se rencontre dans le mucus vaginal des femmes atteintes de vaginite, mais ne joue aucun rôle dans l'étiologie de cette affection. Il a la forme générale du *T. intestinalis*, mais présente à son extrémité antérieure, un, deux ou trois longs flagella ; il porte au voisinage de son extrémité antérieure une rangée de petits cils vibratiles disposés en peigne (fig. 213).


Fig. 214. — Balantidium coli.

INFUSOIRES CILIÉS.

Balantidium coli (*Paramœcium coli*). — Ce protozoaire se rencontre dans l'intestin et les matières fécales de l'homme et du porc. Il a été découvert et décrit par Malmsten; il semble cependant que Leeuwenhoek l'ait vu dans les matières fécales (fig. 214).

Le *B. coli* a une forme ovoïde; sa longueur varie entre 70 et 100 μ, sa largeur entre 50 et 70 μ. La surface du corps est couverte de cils vibratiles fins, courts, disposés régulièrement en lignes longitudinales. A l'extrémité la plus mince du corps se trouve une bouche ou *cytostome* pour l'entrée des matières alimentaires, à l'extrémité large existe un second orifice ou *cytoprocte* pour l'expulsion des déchets de la digestion. Autour de la bouche, les cils se groupent en une couronne touffue et présentent des mouvements qui poussent les aliments vers la bouche. Le protoplasma contient un noyau et deux vacuoles contractiles, on y rencontre fréquemment des corps étrangers ingérés : globules sanguins, grains d'amidon, gouttelettes graisseuses, etc. La reproduction a lieu par division transversale.

La recherche du *Balantidium coli* doit être faite avec toutes les précautions que nous avons exposées à propos des amibes.

TROISIÈME PARTIE

ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

CHAPITRE PREMIER

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'EAU

L'analyse chimique de l'eau ne peut renseigner que sur l'existence de souillures banales; elle permet de déceler la présence des matières organiques, nitrites, chlorures, sels ammoniacaux, etc. L'analyse bactériologique met en lumière les souillures banales de l'eau et permet en outre d'y rechercher la présence d'un certain nombre de microbes pathogènes.

L'analyse bactériologique d'une eau se compose de trois séries d'opérations :

1° Numération des germes (analyse quantitative);

2° Détermination des espèces dominantes ;

3° Recherches spéciales de certains microbes pathogènes (analyse qualitative).

L'eau destinée à l'analyse doit être prélevée avec certaines précautions dont le but est d'éviter l'introduction de microbes étrangers dans l'échantillon ; le transport au laboratoire doit être effectué dans des conditions telles que les germes contenus dans l'échantillon ne puissent se multiplier avant le moment de la mise en analyse, ce qui fausserait les résultats de la numération.

PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT DE L'ÉCHANTILLON.

Prélèvement. — L'échantillon d'eau doit être récolté dans un flacon stérile. Deux à trois cents grammes d'eau suffisent dans la plupart des cas; pour la recherche de certains germes pathogènes

(Vib. du choléra par exemple), il est bon de diposer de 400 à 500 centimètres cubes d'eau. On opérera de la façon suivante :

1° Préparer une fiole en verre blanc, neuve, de 200 à 300 centimètres cubes de capacité ; cette fiole est soigneusement rincée, séchée, puis bouchée à l'ouate et stérilisée au four Pasteur.

2° Au moment de recueillir l'eau, flamber l'orifice de la fiole, enlever le bouchon d'ouate, emplir rapidement la bouteille avec l'eau à analyser et boucher avec un bouchon de liège fin, neuf et dont la surface vient d'être flambée (jusqu'à charbonnement très léger) dans la flamme d'une lampe à alcool. Le bouchon est soigneusement enfoncé, coupé au ras du goulot et recouvert de cire ou mieux d'une capsule de caoutchouc stérilisée ; sur la fiole on colle une étiquette indiquant la provenance de l'échantillon.

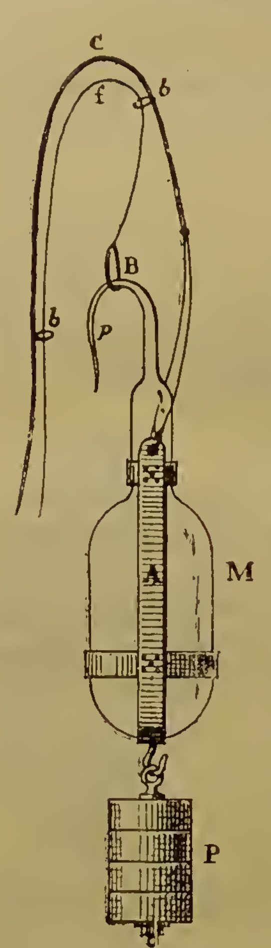


Fig. 215. — Appareil pour prélever les eaux à diverses profondeurs.

Le mode d'emplissage de la fiole varie suivant que l'eau provient d'une conduite, d'un puits, d'une rivière, etc. Quand on prélève l'échantillon au robinet d'une conduite, il faut avoir soin de laisser d'abord l'eau s'écouler pendant plusieurs minutes pour éliminer le liquide qui a séjourné dans les tuyaux. — De même, quand il s'agit d'une pompe, on doit pomper pendant dix à quinze minutes avant de recueillir l'échantillon, afin de se débarrasser de l'eau qui a séjourné dans le corps de pompe.

Dans une rivière, on immergera la fiole en ayant soin d'en diriger le col en sens contraire du courant; on ne devra pas recueillir l'eau trop près du bord et on devra veiller à ce que des éboulis de terre ne viennent pas souiller le liquide au voisinage de l'endroit où l'on opère le prélèvement. — Quand un puits n'est pas pourvu de pompe on peut y descendre le flacon à l'aide d'une ficelle ou prélever l'échantillon dans un des seaux que l'on aura préalablement bien nettoyé et rincé avec l'eau du puits. Il est préférable cependant de s'adresser alors au *matras de Miquel*, qui permet de prélever l'échantillon dans la profondeur même et non uniquement à la surface de l'eau du puits.

Matras de Miquel. — On prend un matras d'essayeur dont on étire le col de façon à obtenir une effilure coudée longue de 5 à 6 centimètres.

L'effilure restant ouverte, on porte le matras dans la flamme de la lampe d'émailleur et on le stérilise en le chauffant fortement ; du même coup l'air contenu dans l'appareil est expulsé, on scelle l'extrémité effilée avant que le matras n'ait commencé à se refroidir. Après refroidissement on entoure la partie inférieure du matras d'un cercle de plomb maintenu par des fils de fer et destiné à permettre l'immersion dans l'eau ; une longue corde, C, fixée à l'appareil permettra de le descendre dans le puits. Un fil métallique mince, *b*, est enroulé et fixé autour de l'extrême pointe de ce fil doit être assez long pour que l'opérateur en tienne constamment une extrémité en main, l'appareil étant immergé (fig. 215).

Pour faire la prise, l'opérateur tenant la corde et le fil métallique descend le matras dans le puits ; quand l'appareil est arrivé à la profondeur désirée, l'opérateur tire brusquement sur le fil métallique et brise ainsi l'effilure : l'eau se précipite dans le matras, il ne reste plus qu'à remonter celui-ci et à sceller l'effilure brisée dans la flamme d'une lampe à alcool.

Transport. — Les germes se multipliant très rapidement dans l'eau à la température ordinaire, il importe que l'échantillon soit placé pendant tout le temps qui s'écoulera jusqu'au moment de l'analyse dans des conditions empêchant cette multiplication. On y parvient en maintenant l'échantillon aux environs de 0° ; quand le laboratoire est éloigné, il importe d'utiliser un mode d'emballage permettant de réaliser cette condition ; on adoptera de préférence le dispositif suivant :

La fiole contenant l'échantillon est placée dans un étui métallique où elle doit entrer à frottement doux (un étui semblable à ceux qui contiennent le sulfate de quinine, certains vésicatoires, etc., convient très bien) ; pour plus de sécurité on assure l'adhérence du couvercle et du corps de l'étui à l'aide d'une bague de caoutchouc disposée en couvre-joint. — L'étui ainsi préparé est placé dans une deuxième boîte métallique (une boîte à biscuits Palmers convient très bien) que l'on emplit de glace concassée en gros fragments ; la boîte métallique elle-même est placée dans une caisse de bois de plus grandes dimensions, qui reçoit, autour de la boîte métallique, de la sciure de bois très modérément tassée. Ce dispositif permet à l'échantillon de rester à la température de la glace fondante pendant vingt-quatre à soixante-douze heures, suivant la saison et la quantité de glace employée ; l'expédition au laboratoire devra toujours être faite par les voies les plus rapides.

On peut à la rigueur se passer de la deuxième boîte métallique et se contenter de placer autour de l'étui une certaine quantité de glace et de verser autour de la sciure de bois ; il faut alors une très grande quantité de sciure pour absorber l'eau de fusion de la glace.

Renseignements. — A chaque envoi d'eau on doit joindre certains renseignements destinés à éclairer l'expert et à le guider dans

son appréciation. Nous reproduisons ici le questionnaire prescrit pour les envois d'échantillons faits aux laboratoires de bactériologie du service de santé militaire (circulaire du 22 juin 1897).

Renseignements pour l'analyse de l'eau de..........

1° Autorité qui a prescrit l'analyse.

2° Causes qui motivent l'analyse (épidémie de....., source à capter, appréciation d'une eau de boisson.....).

3° Provenance de l'échantillon (source, puits, galerie filtrante, citernes, réservoirs,..... dire la profondeur du puits, de la citerne, du réservoir..... et la hauteur de l'eau au moment du prélèvement).

4° Point où l'échantillon a été recueilli (à l'origine d'une source ou au robinet d'une canalisation ? dans un puits ou à la pompe qui le dessert ?.....); — ne jamais recueillir le premier jet d'un robinet ou d'une pompe. — Si l'échantillon a été prélevé dans une rivière, un puits, un réservoir.. .., dire s'il provient de la surface ou du fond ou d'un point intermédiaire. Indiquer la date du dernier nettoyage des citernes ou réservoirs, dire s'il existe des poussières à la surface, des boues au fond.

5° Y a-t-il eu des chutes de pluie ou des fontes de neige dans les jours qui ont précédé le prélèvement de l'échantillon?

L'eau est-elle devenue trouble? Le niveau de l'eau est-il supérieur ou inférieur au niveau normal?

6° Causes de souillures permanentes ou accidentelles auxquelles l'eau paraît exposée.

7° Usages auxquels l'eau est destinée (boisson, cuisines, lavabos, abreuvage des chevaux.....).

8° L'eau est-elle bue sans épuration préalable? Indiquer s'il y a lieu l'appareil d'épuration employé.

9° Température ambiante au moment du prélèvement de l'échantillon.

10° Température de l'eau au même moment.

11° Jour et heure du prélèvement.

12° Observations diverses.

ANALYSE.

I. — NUMÉRATION DES GERMES.

On a proposé de très nombreux procédés de numération des germes de l'eau. Les uns (Miquel) sont basés sur la méthode d'isolement par dilution en milieux liquides (Voy. p. 81) ; les autres utilisent la méthode d'isolement sur plaques de gélatine (méthode de Koch). Nous ne pouvons entreprendre l'étude et la critique de ces diverses méthodes ; nous décrirons avec soin les procédés que nous employons ordinairement.

Dans la numération des germes de l'eau, on adopte généralement comme unité de volume le centimètre cube : on dit qu'une eau contient, par exemple, 50 000 germes par centimètre cube.

La numération s'opérant toujours en milieux aérés, on ne tient pas compte des anaérobies; quand on énonce le nombre de germes que contient une eau, on sous-entend toujours le mot *aérobies*. On pourrait, en utilisant les méthodes d'isolement des anaérobies, se renseigner également sur le nombre de ces microbes dans une eau, mais cette opération, grosse d'ailleurs de difficultés (présence des anaérobies facultatifs, etc.), n'est pas entrée dans la pratique.

On ne s'adresse jamais pour la pratique de la numération à un centimètre cube d'eau : cette quantité d'eau contient un trop grand nombre de microbes, les plaques seraient rapidement envahies et l'opération serait interrompue ; on opère sur une fraction de centimètre cube et l'on ramène ensuite le nombre obtenu à l'unité de volume.

A. **Procédé de la dilution**. — 1° Le goulot de la fiole contenant l'échantillon est soigneusement débarrassé de la cire qui le recouvre, puis flambé dans la flamme du bec de Bunsen ; avec un tire-bouchon flambé on soulève avec précaution le bouchon de façon à pouvoir l'enlever facilement par la suite à l'aide de deux doigts (1).

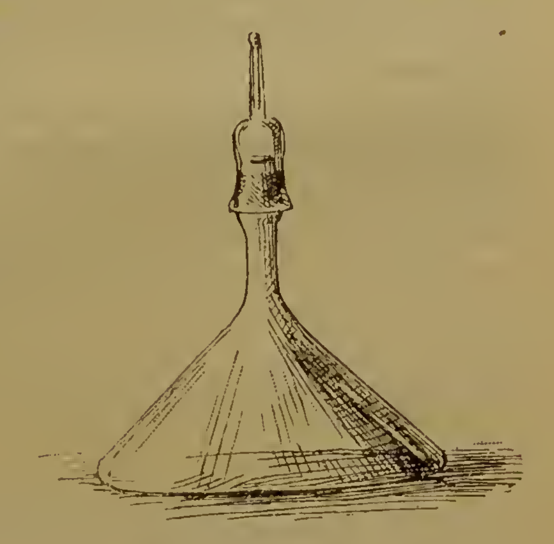


Fig. 216. — Fiole de Gayon.

2° Préparer sur la table de travail :

Une pipette graduée de 10 centimètres cubes ;

Une pipette graduée de 2 centimètres cubes;

Un compte-goutte normal donnant XX gouttes au centimètre cube ;

Tous ces instruments ont été stérilisés et leur grosse extrémité est bouchée à l'ouate ;

Un verre à pied, couvert de papier et flambé ;

Un tube d'eau stérilisé ;

Plusieurs tubes de gélatine stérilisée et liquéfiée au bain-marie ;

Plusieurs fioles de Gayon, bouchées à l'ouate et stérilisées (fig. 216).

3° Avec les précautions ordinaires, on prélève avec la grande pipette 9 centimètres cubes d'eau stérile, que l'on porte dans le verre flambé.

Avec la pipette de 2 centimètres cubes, on prélève ensuite 1 centi-

(1) Avant de déboucher la fiole, l'agiter pour rétablir l'homogénéité du liquide et mélanger le dépôt qui a pu se produire au fond.

mètre cube de l'eau à analyser et on l'ajoute aux 9 centimètres cubes d'eau stérile ; on mélange avec l'extrémité de la pipette. On a ainsi dilué au dixième l'eau à analyser.

4° On flambe le col de la fiole de Gayon, on enlève le bouchon d'ouate et avec le compte-gouttes normal on laisse tomber dans la fiole deux gouttes du mélange pris dans le verre. Ces deux gouttes représentent 1/10e centimètre cube du mélange, c'est-à-dire 1/100e centimètre cube de l'eau à analyser.

5° On saisit un tube de gélatine liquéfiée (la température de la gélatine doit être telle que le tube puisse très aisément être conservé dans la main), on en flambe l'orifice et on en verse rapidement le contenu dans la fiole de Gayon. On replace le bouchon d'ouate sur la fiole, puis on communique à celle-ci des mouvements d'oscillation pour bien mélanger les gouttes d'eau et la gélatine ; cela fait, on dispose la fiole sur un plan horizontal et froid où la gélatine ne tarde pas à faire prise.

On a en définitive opéré un isolement sur plaque de gélatine portant sur 1/100e centimètre cube de l'eau à analyser.

6° Les colonies ne tardent pas à se développer sur la gélatine ; chacun des germes contenus dans l'eau donnera naissance à une colonie, compter ces colonies sera compter les germes contenus dans la gouttelette d'eau ensemencée. Chaque jour on inspecte la fiole en la retournant de façon à la voir par sa face plane ; les colonies apparaissent par transparence à travers le fond de l'appareil. Si le troisième jour, par exemple, on note douze colonies, on écrira sur la feuille d'expérience :

3e jour..................................	5 août	12 colonies.

Pour ne pas être exposé à compter deux fois les mêmes colonies, on les marque sur le fond de la fiole, au fur et à mesure de la numération, d'un point d'encre fait avec la plume à écrire.

Si le lendemain (quatrième jour), à côté des douze colonies marquées à l'encre, on en trouve huit nouvelles, la feuille d'analyse portera :

3e jour..........................	5 août	12 colonies.	
4e —	6 —	20 —	(12 + 8).

Si le cinquième jour ont apparu dix colonies, on ajoute :

5e jour.........................	2 août	30 colonies (20 + 10).

La numération est d'ordinaire terminée du quinzième au vingtième jour ; à cette époque aucune colonie nouvelle ne se développe plus. Supposons que l'on trouve alors :

20e jour..................................	22 août	64 colonies.

On obtiendra le nombre de germes aérobies par centimètre cube en multipliant par 100 le chiffre 64, soit

$$64 \times 100 = 6400.$$

L'eau soumise à l'analyse contient donc 6400 germes aérobies par centimètre cube.

Il est bon de préparer, pour un même échantillon, plusieurs fioles de Gayon que l'on numérote 1, 2, 3, etc. On fait la moyenne des résultats fournis par chaque opération et on obtient ainsi un chiffre beaucoup plus voisin de la réalité. Il arrive d'ailleurs fréquemment que les résultats obtenus avec chaque fiole soient les mêmes à un très petit nombre de bactéries près.

Mais, dans le cas que nous venons d'étudier, nous avons supposé que la liquéfaction de la gélatine ne venait pas entraver la numération. Il n'en est malheureusement pas ainsi le plus souvent; les eaux contiennent fréquemment en proportion notable des bactéries liquéfiantes, si bien que dès les premiers jours les plaques de gélatine peuvent être envahies par la liquéfaction : la numération devient alors impossible. On doit continuer la numération tant que la plaque n'est pas totalement envahie, puis on note la date de la liquéfaction. Si nous trouvons par exemple :

2e jour	26 colonies.
3e —	59 —
4e —	102 —
5e —	liquéfaction totale.

Nous formulerons ainsi les résultats de l'analyse :

10 200 (102 × 100) *germes aérobies par centimètre cube; ce chiffre est de beaucoup inférieur à la réalité, la liquéfaction de la gélatine ayant interrompu la numération dès le cinquième jour.*

Si la numération avait été interrompue seulement vers le huitième jour, on écrirait :

10 200 *germes aérobies par centimètre cube; ce chiffre est inférieur à la réalité, la liquéfaction de la gélatine ayant interrompu la numération le huitième jour.*

La phrase restrictive sera ajoutée toutes les fois que la liquéfaction sera survenue avant le dixième jour environ.

Remarque. — Beaucoup d'eaux renferment, à côté des bactéries, des moisissures qui se développent sur les plaques; on comptera ces moisissures à part, on dira par exemple qu'une eau contient :

1256 *germes aérobies et* 300 *moisissures par centimètre cube.*

B. **Procédé de la pipette au 1/50e de centimètre cube.** —

La méthode des dilutions a l'inconvénient d'être un peu longue et de multiplier les causes de souillure entre des mains peu expérimentées, aussi lui préfère-t-on souvent le procédé suivant, beaucoup plus expéditif.

On utilise des pipettes fabriquées par Alvergniat, très soigneusement jaugées et donnant environ 50 gouttes au centimètre cube ; les difficultés de la construction ne permettent pas d'obtenir des pipettes donnant toutes exactement 50 gouttes, certaines donneront 48, 52, 54 gouttes au centimètre cube, mais chacune d'elles porte gravé sur le verre le nombre exact des gouttes qu'elle fournit au centimètre cube.

Supposons que nous ayons une pipette donnant 1/52e de centimètre cube ; après l'avoir flambée soigneusement, nous y aspirons un peu d'eau à analyser et nous laissons tomber une goutte de cette eau directement dans la fiole de Gayon ; nous ajoutons la gélatine et nous opérons la numération comme plus haut à partir du temps 5.

En multipliant par 52 le chiffre des colonies développées dans la fiole, on obtient le nombre des germes aérobies par centimètre cube ; si nous avons compté 96 colonies, nous aurons ;

$$96 \times 52 = 4992 \text{ germes aérobies par centimètre cube.}$$

Il importe de faire toujours deux ou trois numérations et de prendre une moyenne.

APPRÉCIATION DES RÉSULTATS DE LA NUMÉRATION.

Les résultats de la numération doivent toujours être corroborés par ceux fournis par la détermination des espèces : on conçoit qu'une eau contenant un grand nombre de saprophytes inoffensifs (B. subtilis, Coccus blanc de l'eau, etc.) soit infiniment meilleure qu'une eau qui contiendrait en très petite quantité un bacille pathogène tel que le bacille typhique. Cependant, au point de vue du degré de souillure banale de l'eau, la numération fournit des résultats importants. Miquel a construit une échelle permettant de juger une eau d'après sa teneur en germes, mais les indications de cette échelle ne sont aucunement absolues et ne doivent être prises en considération qu'après les résultats de l'analyse qualitative.

Echelle de Miquel.

0 à 10 germes	par	centimètre cube....	Eau excessivement pure.
10 à 100	—	—	— très pure.
100 à 1000	—	—	— pure.
1000 à 10000	—	—	— médiocre.
10.000 à 100.000	—	—	— impure.
plus de 100.000	—	—	— très impure.

Remarque. — Les résultats de la numération n'ont rien d'absolu; après ce que nous avons dit, dans cet ouvrage, du rôle des microbes empêchants, on comprendra que certaines bactéries ne se développent pas sur les plaques, empêchées qu'elles sont par la présence d'autres microbes. Ceci s'applique particulièrement aux bactéries pathogènes qui ne se développent guère sur les plaques de gélatine où elles sont gênées par la présence des saprophytes et où elles se trouvent dans des conditions de température défavorables à leur culture.

II. DÉTERMINATION DES ESPÈCES.

A. — ISOLEMENT DES ESPÈCES SAPROPHYTES.

Pour isoler et étudier les espèces microbiennes contenues dans une eau, on a recours à la méthode d'isolement sur gélatine en boîtes de Petri, telle que nous l'avons décrite précédemment. Une goutte de l'eau sert à ensemencer un tube de gélatine : après agitation, deux ou trois gouttes du contenu de ce tube sont reportées dans un second tube qui fournira la matière d'ensemencement d'un troisième. Sur les boîtes de Petri ainsi préparées on suivra le développement des colonies et on pratiquera les prélèvements nécessaires pour les épreuves de détermination des germes.

La détermination des divers microbes des eaux exige, pour les commençants, de nombreuses recherches : chaque colonie doit être examinée à l'œil nu, au microscope, puis les microbes qui la constituent sont réensemencés dans les divers milieux, soumis à l'examen microscopique, inoculés aux animaux de laboratoire. Mais, avec un peu d'habitude, on arrive à reconnaître très aisément la plupart des colonies que l'on est exposé à rencontrer dans les eaux.

Il n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage de décrire les espèces saprophytes des eaux. Certaines de ces espèces sont absolument inoffensives, d'autres, telles que le Proteus vulgaris, le Micrococcus prodigiosus, etc., fabriquent des produits solubles capables de déterminer chez l'homme et les animaux des phénomènes d'intoxication ; ces espèces se développent de préférence aux dépens des matières animales en putréfaction, leur présence dans une eau doit faire porter un jugement défavorable sur cette eau. On ne devra jamais négliger de noter l'odeur exhalée par les plaques d'isolement; les colonies de bactéries putrides exhalent des odeurs fétides, ammoniacales.

La méthode des plaques de gélatine ne permet pas de déceler la présence de la plupart des microbes pathogènes, aussi conseillons-

nous de toujours pratiquer en même temps l'épreuve suivante que nous employons avec beaucoup de succès depuis 1894.

B. — RECHERCHE DES ESPÈCES PATHOGÈNES EN GÉNÉRAL.

Dans des tubes de bouillon ou mieux de pepto-gélo-sel de Metchnikoff, on ensemence 0,5 à 2 centimètres cubes de l'eau à analyser; les tubes sont immédiatement portés à l'étuve à 38°. Parfois il ne se produit aucun développement pendant les premières vingt-quatre heures, on peut alors interrompre la recherche et considérer les résultats comme définitivement négatifs. Souvent au contraire il se produit dès la cinquième à huitième heure un trouble dans les tubes ensemencés. Ce trouble précoce est presque toujours dû à la présence de microbes pathogènes ou du bacterium coli, les bactéries saprophytes se développant plus lentement à + 38°. Dès que le trouble est marqué (sixième à dixième heure), on prélève une öse du contenu du tube et on pratique un second passage dans les mêmes conditions; dès que le deuxième tube est trouble, on en prélève une trace avec laquelle on pratique des isolements en stries sur plaques de gélose; les plaques sont placées à 37° et les colonies de pathogènes s'y développent très rapidement. Nous avons pu ainsi isoler de diverses eaux le bacille du pus bleu, les microbes de la suppuration, le bacille de Friedländer, le bacterium coli.

La présence du bacterium coli ou de bactéries voisines est fréquemment notée dans les eaux; jadis on attachait une grande importance à cette présence et l'on condamnait toute eau contenant le bacille du colon; aujourd'hui que les procédés de recherche se sont perfectionnés et que l'on trouve ce bacille dans un très grand nombre d'échantillons d'eaux, on tend à n'accorder aucune signification à sa présence et à le considérer comme un saprophyte banal. Pour nous la vérité se trouve entre ces deux opinions extrêmes : si la présence de bactéries coliformes est parfois insignifiante, on ne peut nier que le bacterium coli n'indique souvent l'intervention directe d'une souillure fécale ; de plus, il ne faut pas oublier que l'on trouve ce microbe dans un grand nombre d'échantillons d'eaux typhogènes où il peut masquer la présence du bacille typhique.

Toutes les fois que nous avons isolé d'une eau un bacterium coli, nous en étudions avec soin tous les caractères : s'il y a concordance absolue entre ces caractères et ceux du bacille d'Escherich type (nous attachons une grande importance à la *coagulation rapide* du lait) et si le bacille étudié se montre pathogène pour le cobaye (1/2 à 1 centimètre cube de culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures inoculé dans

le péritoine), nous n'hésitons pas à porter un jugement défavorable sur la qualité de l'eau en analyse. La présence concomittante de bactéries de la putréfaction rendra encore plus probable l'origine fécale de la souillure.

Nous attribuons une grande importance à l'épreuve de l'inoculation aux animaux des microbes isolés des eaux et cultivant à 37°, nous ne négligeons jamais d'y avoir recours avant de porter un jugement définitif.

C. — RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DE CERTAINS GERMES PATHOGÈNES.

Quand on se trouve en présence d'une épidémie de fièvre typhoïde, de choléra, de cas de charbon, etc., on recherche systématiquement dans l'eau les germes de ces maladies.

On recherche le plus ordinairement le bacterium coli, le bacille typhique, le bacille de Friedländer, la bactéridie charbonneuse, le vibrion du choléra, etc. Dans la seconde partie de cet ouvrage, nous avons indiqué les méthodes spéciales s'appliquant à la recherche dans les eaux de chacun de ces différents germes.

CHAPITRE II

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'AIR

L'analyse bactériologique de l'air peut être quantitative ou qualitative, selon que l'on se propose de compter les microbes contenus dans un volume d'air ou que l'on veut déterminer à quelles espèces appartiennent ces germes; enfin on peut rechercher dans l'air la présence d'un germe pathogène donné.

L'air contenant un nombre restreint de microbes, on adopte comme unité de volume le mètre cube, on dit par exemple que l'air d'une salle contient 500, 1000, 3000 germes par mètre cube.

Longtemps on s'est contenté de pratiquer l'examen microscopique des poussières de l'air recueillies à l'aide d'un *aéroscope*. L'aéroscope le plus employé en France est celui de Pouchet. C'est un petit cylindre de verre fermé à sa partie supérieure et à sa partie inférieure. A l'intérieur, vers la partie moyenne, un chevalet soutient une lame porte-objet maintenue par deux valets et au centre de laquelle on dépose une goutte de glycérine: le plafond de l'appareil est percé à son centre d'un orifice circulaire portant un petit entonnoir de platine, plongeant dans le cylindre et dont la petite extrémité vient s'ouvrir en face du centre de la lame porte-objet. Une tubulure située à la partie inférieure de l'aéroscope est reliée à un aspirateur. L'aspirateur fonctionnant, l'air extérieur appelé par l'entonnoir vient se briser contre la lame porte-objet et y abandonne ses poussières qui sont retenues grâce à la viscosité de la glycérine. Quand on a fait passer une quantité d'air suffisante, on arrête l'aspiration, on enlève la lame de verre, on dissémine les poussières dans la glycérine à l'aide d'une aiguille stérilisée, on recouvre d'une lamelle et on porte sous le microscope. On peut ainsi étudier les poussières grossières de l'air: spores de champignons, de moisissures, pollen, grains d'amidon, corpuscules minéraux, etc.; mais les bactéries et leurs spores échappent à ce mode de recherche. Aussi aujourd'hui emploie-t-on presque uniquement la méthode des cultures.

I. — Pasteur, le premier, entreprit l'analyse de l'air par la méthode des cultures. Il prend une série de ballons à long col emplis au tiers de bouillon de veau; le col de chacun de ces ballons est étiré à la lampe, puis on stérilise le ballon et on en ferme l'effilure d'un trait

de chalumeau, le bouillon étant encore en ébullition. Le ballon est ainsi privé d'air, il suffit de le transporter au lieu où l'on doit effectuer le prélèvement et d'en briser l'effilure, l'air s'y précipite avec les poussières qu'il renferme; le col est alors scellé de nouveau et le ballon est abandonné à lui-même. On répète l'opération avec un grand nombre de ballons. Bientôt le contenu d'un certain nombre de ces ballons se trouble; du nombre des ballons troublés, on déduit le nombre des germes contenus dans l'atmosphère. Si, par exemple, on a opéré avec 50 ballons dont chacun contient approximativement 500 centimètres cubes d'air et si 20 de ces ballons ont troublé on dira : 25 litres d'air ont donné 20 germes, un mètre cube renferme par conséquent, très approximativement, $\frac{20}{25} \times 10\,000$, c'est-à-dire 8 000 germes. Cette méthode très simple exige un matériel considérable et encombrant, on ne peut y avoir recours dans la pratique.

II. **Procédé de Koch.** — Le procédé de Koch consistant à exposer à l'air pendant un temps plus ou moins long des plaques de gélatine, sur lesquelles on étudie les colonies qui se développent par la suite, ne peut être utilisé pour l'analyse quantitative.

III. **Procédé de Hesse.** — Hesse a indiqué un procédé basé sur le principe de l'aéroscope et qui a le mérite de la simplicité; malheureusement il ne fournit que des résultats approximatifs.

On prend un tube de verre long de 50 à 70 centimètres et ayant 4 à 5 centimètres de diamètre (fig. 217). On obstrue une de ses extrémités avec un bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre muni d'un tampon d'ouate; son autre extrémité est recouverte de deux capsules de caoutchouc superposées; la plus interne de ces capsules porte à son centre un trou de un centimètre de diamètre. On stérilise

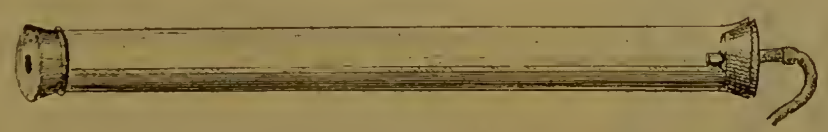


Fig. 217. — Tube de Hesse.

l'appareil, puis on y introduit par la capsule perforée environ 50 centimètres cubes de gélatine stérilisée liquéfiée, on remet immédiatement la deuxième capsule de caoutchouc, on place le tube dans une position horizontale et on laisse faire prise à la gélatine : celle-ci doit constituer dans le tube une couche régulière à surface horizontale, n'atteignant pas le niveau de l'orifice du petit tube de verre ni celui de l'ouverture du capuchon de caoutchouc. L'appareil est alors prêt à servir; au moment du besoin on enlève le premier capuchon

de caoutchouc, on relie le petit tube de verre à un aspirateur et on fait passer lentement 10 à 15 litres d'air. L'air entre par le trou du capuchon de caoutchouc, vient lécher la surface de la gélatine et y abandonne ses poussières. L'aspiration terminée, on replace la deuxième capsule de caoutchouc et on porte l'appareil à l'étuve à + 20°. Des colonies apparaissent bientôt sur la gélatine; elles sont plus nombreuses dans la première partie du tube; on les compte et on effectue les prélèvements nécessaires pour la détermination des espèces. Si l'on a fait passer 15 litres d'air et que l'on compte dans le tube 6 colonies bactériennes et 10 moisissures, l'air contiendra approximativement :

$$\frac{6}{15} \times 10000 = 4000 \text{ bactéries aérobies par mètre cube.}$$

et

$$\frac{10}{15} \times 10000 = 6666 \text{ moisissures par mètre cube.}$$

Mais beaucoup de germes s'accolent aux parois du tube et sont perdus pour la numération; de plus, si l'opération se poursuit pendant un certain temps, la gélatine se dessèche et devient impropre à la culture; enfin le courant d'air doit être très lent, sans quoi beaucoup de germes sont entraînés.

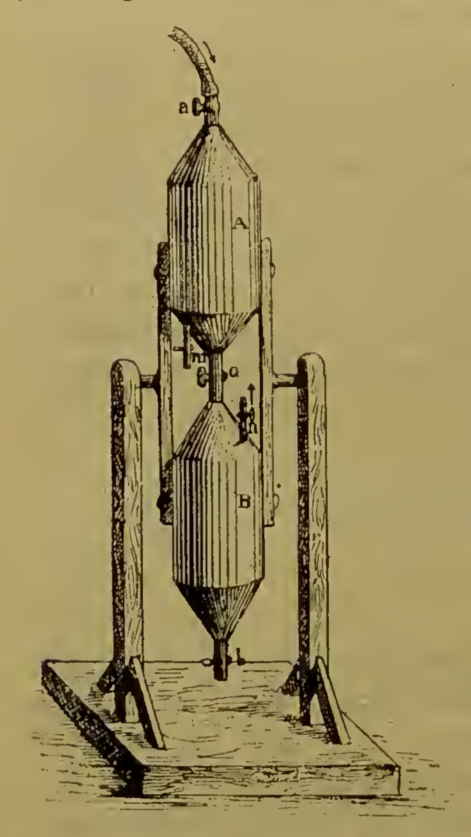


Fig. 218. — Aspirateur à eau.

A tous ces procédés on préfère aujourd'hui ceux qui consistent à dépouiller l'air de ses germes au moyen du barbottement dans un peu de liquide visqueux ou de la filtration sur un corps pulvérulent. On obtient ainsi sous un petit volume la totalité des germes contenus dans le volume d'air étudié; ces germes sont, ou disséminés dans le liquide, ou mélangés à la poudre qui constitue le filtre; on n'a plus alors qu'à opérer selon les méthodes générales que nous avons exposées à propos de l'isolement des germes et des analyses d'eau. Il sera toujours bon de pratiquer des isolements sur plaques de gélose, en même temps que les isolements sur gélatine, les plaques de gélatine étant fréquemment liquéfiées en peu de temps.

La mise en pratique de ces procédés d'analyse de l'air exige l'emploi d'appareils aspirateurs ; on utilise d'ordinaire l'aspirateur à eau (fig. 218) en usage dans les laboratoires de chimie, qui permet de mesurer très exactement la quantité d'air aspirée. On peut encore employer la trompe à eau, mais il faut, dans ce cas, interposer, entre l'appareil à barbotement et la trompe, un compteur à gaz qui renseignera sur les quantités d'air aspirées. L'aspiration doit toujours être lente, régulière, les bulles doivent éclater une à une dans le liquide du barboteur. De nombreux appareils permettent d'appliquer le principe du barbotement et de la filtration.

PROCÉDÉS PAR FILTRATION.

I. **Bourres insolubles.** — **1° Procédé de Petri.** — Dans un tube de verre de 10 centimètres de long sur 15 millimètres de diamètre, on dispose à chaque extrémité une paire de petits culots de toile métallique (b^1, b^2, b^3, b^4, fig. 219), délimitant deux loges (c^1 et c^2) de 3 centimètres de long que l'on remplit de sable très fin préalablement porté au rouge. On bouche à l'ouate les deux extrémités du tube et on stérilise le tout au four Pasteur. L'appareil refroidi, on remplace un des tampons d'ouate par un bouchon de caoutchouc perforé stérilisé, *d*, portant un tube de verre muni d'une bourre d'ouate, *f*. Pour l'usage, on relie ce dernier tube à l'aspirateur, on enlève le tampon d'ouate de l'autre extrémité de l'appareil et on fait passer lentement 100 litres d'air. L'aspiration terminée, on dissémine le sable des bourres dans de la gélatine avec laquelle on prépare des plaques de Petri. Ce procédé est compliqué et peu pratique.

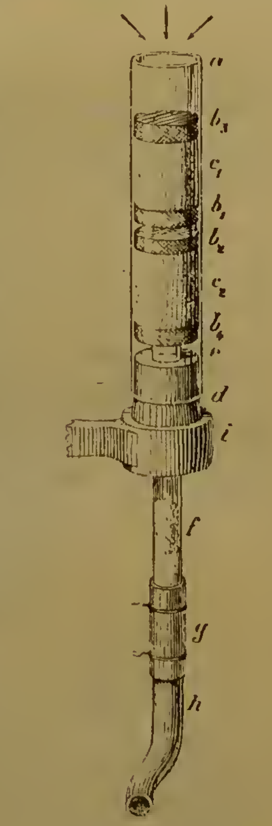


Fig. 219. — Filtre à sable de Petri pour les germes de l'air.

2° Procédés de Frankland. — On prépare des tubes analogues à ceux de Petri, mais en remplaçant le sable par du coton de verre ou de l'amiante, ce qui supprime l'emploi des culots métalliques. Après aspiration, la bourre est dissociée dans une quantité connue de bouillon qui sert à ensemencer des plaques de gélatine. Cette méthode très simple n'est pas précise : les germes adhèrent à l'amiante et au coton de verre et leur dissémination dans le bouillon n'est jamais complète.

II. **Bourres solubles** (Pasteur). — La substitution des poudres solubles aux bourres insolubles a pour effet de permettre l'exacte répartition des germes dans la gélatine et de rendre par conséquent très exacts les résultats de la numération. Malheureusement, ce procédé n'est pas applicable quand l'atmosphère est chargée d'humidité; les bourres s'hydratent, deviennent déliquescentes et ne retiennent plus les germes.

On utilise d'ordinaire comme bourre la poudre de sulfate de soude. On fond ce sel dans un vase en fer, on le pile, on tamise la poudre obtenue et on la place dans un tube de verre disposé ainsi que l'indique la figure 220. Une des extrémités du tube est bouchée à l'ouate, au-dessus existe un étranglement qui retient une petite bourre d'amiante sur laquelle on place la poudre de sulfate de

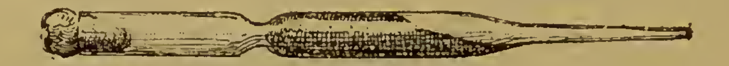


Fig. 220. — Filtre à bourre soluble.

soude sur une hauteur de 8 centimètres environ; enfin, on étire et ferme à la lampe la seconde extrémité du tube. On stérilise l'appareil dans le four de Pasteur. Pour l'usage, on tasse la poudre contre le tampon d'amiante par de légères secousses imprimées à l'appareil, puis on casse l'extrémité effilée du tube et on met l'extrémité bouchée à l'ouate en communication avec un aspirateur.

L'opération terminée, on fait tomber dans une quantité connue de bouillon la poudre de sulfate de soude; dès que la dissolution est complète, on utilise le bouillon pour ensemencer les plaques d'isolement. Comme contrôle, on porte avec une pince flambée la bourre d'amiante dans un tube de bouillon qui doit rester stérile.

PROCÉDÉS PAR BARBOTEMENT.

1° **Procédé de Straus et Wurtz.** — Un cylindre de verre porte à son extrémité inférieure un petit appendice d'environ 10 centimètres cubes de capacité, dans lequel on verse 10 centimètres cubes de gélatine liquéfiée, à la surface de laquelle on place quelques gouttes d'huile (fig. 221).

La partie supérieure du cylindre porte une tubulure latérale munie d'un tampon d'ouate et un orifice central rodé, obturé hermétiquement par un tube de verre dont l'extrémité inférieure plonge jusqu'au fond de l'appendice à gélatine et dont l'extrémité supérieure, se terminant au dehors, est munie d'un tampon d'ouate. On

stérilise l'appareil à l'autoclave. Pour l'usage, on plonge l'appendice inférieur dans de l'eau à 40° environ, pour liquéfier la gélatine, on relie la tubulure latérale à un aspirateur et on enlève la bourre d'ouate qui obturait le tube central. L'air aspiré descend par le tube central et vient barboter dans la gélatine où il se dépouille de ses germes (la goutte d'huile empêche la gélatine de mousser pendant l'opération). Quand on a fait passer dix litres d'air, on arrête l'aspiration. En soufflant doucement par la tubulure latérale, on fait monter la gélatine plusieurs fois dans le tube central pour le laver; enfin on prépare des plaques avec la gélatine.

Cet appareil est très commode, mais beaucoup de germes s'arrêtent dans le tube d'arrivée qui est très long et présente des irrégularités, aussi les résultats obtenus ne sont-ils pas très rigoureux; de plus, on ne peut opérer que sur une petite quantité d'air.



Fig. 221. — Appareil de Straus et de Wurtz.



Fig. 222. — Ballon de Miquel.

2° **Procédé de Miquel.** — Un ballon Pasteur porte une tubulure centrale descendant jusqu'au bord de sa panse et deux tubes latéraux situés à la partie supérieure. Un capuchon de verre rodé permet d'obturer le tube central ; une des tubulures latérales est bouchée à l'ouate, l'autre est effilée et fermée à la lampe, elle sert à la répartition du liquide quand l'opération est terminée. On place dans le ballon 30 centimètres cubes d'eau et on stérilise le tout à l'autoclave. Pour l'usage, on relie à l'aspirateur la tubulure bouchée à

l'ouate et on enlève le capuchon de verre qui couvre la tubulure centrale : pendant l'aspiration, l'air barbote dans l'eau du ballon. Quand l'aspiration est terminée, on fait monter plusieurs fois le liquide dans la tubulure centrale pour la laver et recueillir les germes qui ont pu s'y déposer, puis on brise l'extrémité de la tubulure effilée et on répartit le liquide dans un grand nombre (30 à 50) ballons de culture contenant du bouillon. La plongée du tube dans le liquide n'est pas suffisante et beaucoup de germes échappent à l'observation.

3° **Procédé de Laveran.** — *Procédé de choix.* — Laveran emploie un dispositif très simple, peu fragile et qui donne des résultats très exacts. Deux tubes de verre fermés à leur extrémité inférieure sont réunis au niveau de leur tiers supérieur par une tubulure horizontale. Chacun des tubes verticaux est obturé à sa partie supérieure par un bouchon de caoutchouc traversé par une pipette qui plonge jusqu'à la partie inférieure de l'appareil. Un des tubes porte un trait gravé sur le verre et délimitant une capacité de 10 centimètres cubes à partir du fond du tube; une des pipettes est graduée en dixièmes de centimètre cube; l'orifice supérieur de chaque pipette est obturée par un tampon d'ouate; dans le tube jaugé on place 10 centimètres cubes d'eau sucrée à 1 p. 100, puis l'appareil est stérilisé à l'autoclave.

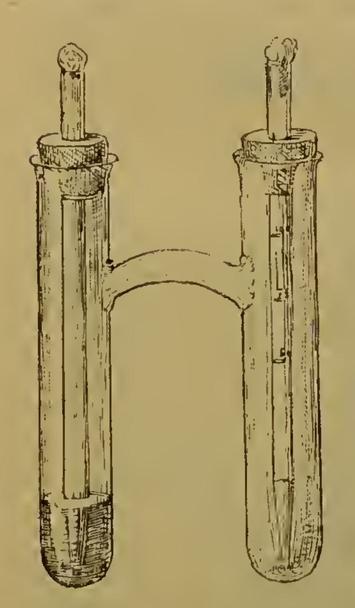


Fig. 223. — Tube de Laveran.

Pour l'usage, on enlève le tampon de coton garnissant la pipette qui plonge dans l'eau sucrée et on met l'autre pipette en communication avec l'aspirateur. L'air aspiré barbote dans l'eau sucrée, passe dans la première branche, s'engage dans le tube horizontal, descend dans la deuxième branche et s'échappe par la pipette en communication avec l'aspirateur. On peut faire passer ainsi une très grande quantité d'air dans l'appareil.

Le barbotement terminé, on aspire doucement l'eau sucrée dans la pipette d'entrée, de manière à la laver, puis on fait passer le liquide dans la deuxième branche et dans la deuxième pipette à plusieurs reprises différentes pour recueillir les germes qui ont pu s'y déposer; il ne reste plus alors qu'à prélever l'eau sucrée à l'aide de la pipette graduée pour la répartir dans les différents milieux de culture (plaques de gélatine, plaques de gélose).

Si, par exemple, il est passé 200 litres d'air dans l'appareil et que

l'ensemencement en plaque de gélatine d'un centimètre cube d'eau sucrée donne douze colonies, nous avons :

200 litres d'air contiennent 12×10 germes aérobies.

1 mètre cube d'air contient $\frac{12 \times 10 \times 10000}{200} = 6000$ germes aérobies.

Cette méthode présente l'avantage de fournir un matériel d'ensemencement abondant, représentant une grande quantité d'air et permettant la préparation de nombreuses plaques d'isolement et aussi la pratique des recherches spéciales des microbes pathogènes (1).

(1) Voir ce qui a été dit à propos de chacun de ces microbes. La recherche du bacille tuberculeux devra toujours être faite par la méthode des inoculations au cobaye.

TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES

K

L

M

N

O

P

R

3047-97. — Corbeil. Imprimerie Ed. Crété.

